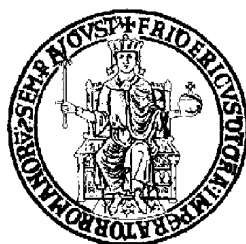


Università degli Studi di Napoli “Federico II”

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CLINICHE E
FARMACOTOSSICOLOGICHE VETERINARIE XXXIII
CICLO**



Indirizzo in Medicina Interna degli Animali Domestici

Tesi sperimentale

*Studio clinico e parassitologico di campo (fase III) per la
valutazione di un prodotto vaccinale anti-Leishmania in cani
naturalmente esposti.*

Parte II: valutazione clinica e diagnosi xenobiotica

Dr. De Santo Roberta

Tutor

Prof. Gaetano Oliva

Coordinatore

Prof. Paolo Ciaramella

INDICE

1 Premessa	p. 6
2 Introduzione	p. 7
3 La Leishmaniosi	p. 9
3.1 Cenni storici	p. 9
3.2 Eziologia	p. 11
3.3 Ciclo biologico	p. 14
3.4 Epidemiologia	p. 18
3.4.1 Epidemiologia delle leishmaniosi zoonotiche da <i>Leishmania infantum</i> nel bacino del Mediterraneo	p. 22
3.4.2 Leishmaniosi viscerale zoonotica	p. 22
3.4.3 Leishmaniosi cutanea sporadica	p. 25
3.4.4 Epidemiologia della leishmaniosi in Italia	p. 27
3.4.4.1 Leishmaniosi umana	p. 27
3.4.4.2 Leishmaniosi canina	p. 28
3.5 Vettore	p. 33
3.6 Modalità di contagio	p. 38
3.6.1 Indiretto	p. 38
3.6.2 Diretto	p. 38
3.7 Patogenesi	p. 39
3.8 Sintomatologia	p. 44
3.9 Diagnosi	p. 53
3.9.1 Esami diretti	p. 54
3.9.1.1 Esami cito-istologici	p. 56
3.9.1.1.1 Esame citologico	p. 56
3.9.1.1.2 Esame istologico	p. 57
3.9.1.1.3 Esame istochimico	p. 57

3.9.1.2. Esame colturale	p. 58
3.9.1.3 Xenodiagnosi	p. 58
3.9.1.4 Esami molecolari	p. 59
3.9.1.4.1 Polymerase chain reaction (PCR) e Nested-PCR	p. 60
3.9.1.4.2 PCR quantitativa (Real time PCR)	p. 60
3.9.2 Esami indiretti	p. 62
3.9.2.1 Esami sierologici	p. 62
3.9.2.1.1 IFAT	p. 63
3.9.2.1.2 ELISA	p. 65
3.9.2.1.3 Counterimmunoelectrophoresis (CIE)	p. 66
3.9.2.1.4 Saggio di immunodiffusione (IDA)	p. 66
3.9.2.1.5 Test di agglutinazione diretta (DIA)	p. 66
3.9.2.1.6 Immunomigrazione rapida	p. 67
3.9.2.1.7 Western blotting (WB)	p. 67
3.9.2.1.8 Fluorocitometria (FC)	p. 67
3.9.3 Prove di laboratorio aspecifiche	p. 68
3.10 Terapia	p. 71
3.10.1 Terapia specifica	p. 71
3.11 Profilassi	p. 74
3.11.1 Profilassi igienico-sanitaria	p. 75
3.11.2 Profilassi vaccinale	p. 79
3.11.2.1 Molecole vaccinali sperimentate contro la Leishmaniosi canina	p. 80
4 Parte sperimentale	p. 88
4.1 Introduzione	p. 88
4.1.1 Caratteristiche del vaccino	p. 90
4.2 Natura e obbiettivo dello studio	p. 91
4.3 Summary of the trial	p. 91
4.4 Materiali e metodi	p. 93

4.4.1 Animali	p. 93
4.4.2 Gruppi	p. 93
4.4.3 Alloggio	p. 93
4.4.4 Seconda fase	p. 95
4.4.4.1 Check-up completo	p. 96
4.4.4.2 Check-up parziale	p. 96
4.4.5 Follow-up clinico	p. 98
4.4.5.1 Valutazione	p. 98
4.4.6 Trattamenti non consentiti	p. 100
4.4.7 Trattamenti antiparassitari	p. 101
4.4.7.1 Trattamenti contro le zecche	p. 101
4.4.7.2 Trattamenti antielmici	p. 101
4.4.8 Vaccinazioni DHPP	p. 101
4.4.9 Campioni	p. 103
4.4.9.1 Identificazione dei campioni	p. 103
4.4.9.2 Campioni di sangue	p. 103
4.4.9.2.1 Campioni di sangue in EDTA	p. 104
4.4.9.3 Ago aspirato midollare	p. 104
4.4.9.4 Aspirato linfonodale popliteale	p. 105
4.4.10 Sierologia IFAT	p. 105
4.4.11 Analisi ematologiche	p. 106
4.4.12 Analisi biochimiche	p. 106
4.4.13 Coltura dei parassiti	p. 107
4.4.13.1 Terreno di coltura	p. 107
4.4.14 Estrazione del DNA	p. 109
4.4.14.1 PCR	p. 109
4.4.14.2 Nested-PCR	p. 109
4.4.14.3 Realtime-PCR	p. 110
4.4.15 Eventi avversi	p. 111

4.4.16 Xenodiagnosi	p. 112
4.4.16.1 Protocollo xenodiagnosi	p. 112
4.4.17 Classificazione delle categorie di infezione	p. 113
5 Risultati	p. 114
5.1 Protocollo vaccinale	p. 114
5.2. Risultati xenodiagnosi	p. 136
6 Discussione	p. 138
Appendice 1	p. 141
Bibliografia	p. 151

1. Premessa

La presente tesi, unitamente a quella della candidata Paparcone Rossella, descrive le metodiche e i risultati non completi di uno studio clinico di Fase III (esposizione dei soggetti all'infezione naturale) condotto in Italia per valutare l'efficacia di un vaccino anti-*Leishmania*, sia nei confronti dell'attecchimento dell'infezione (tesi della dr.ssa Paparcone), sia per valutare il grado di protezione nell'eventuale progressione dell'infezione verso la malattia (tesi della dr.ssa De Santo). Uno studio analogo, che utilizza lo stesso protocollo descritto nelle succitate tesi, è stato condotto anche in un'altra nazione europea, senza che le candidate siano a conoscenza dei risultati ottenuti. Il trial clinico, regolarmente autorizzato dal Ministero della Salute, è stato supportato da una casa farmaceutica veterinaria alla quale appartengono i diritti di pubblicazione dei risultati nella loro interezza. Per i motivi sopra esposti, i risultati e le conclusioni descritte nelle presenti tesi non sono da considerare sovrapponibili a quelli complessivi e definitivi e non costituiscono alcuna indicazione favorevole o sfavorevole per l'utilizzazione in commercio del vaccino stesso. Inoltre, quanto descritto nel capitolo "Caratteristiche del vaccino" si riferisce ad una composizione di base già descritta in letteratura, ma parzialmente diversa da quella effettivamente utilizzata nel presente studio, ancora coperta da segretezza. Lo scopo principale delle presenti tesi, quindi, non è quello di fornire dati a sostegno o a sfavore dell'efficacia del vaccino, quanto piuttosto quello di divulgare un modello ideale di studio di un vaccino anti-*Leishmania*, applicabile in una fase clinica III, secondo criteri di Good Clinical Practice.

2. Introduzione

La Leishmaniosi è una malattia infettiva e contagiosa, di natura parassitaria, sostenuta da un protozoo appartenente al Genere *Leishmania* (Subphylum *Sarcomastigophora*, Classe *Mastigophora*, Famiglia *Tripanosomatidae*), trasmessa da ditteri ematofagi (Genere *Phlebotomus*)¹.

È endemica nel bacino del Mediterraneo² e tipica delle regioni temperate e tropicali.^{3 4}

È un'importante meta-zoonosi in costante aumento, si stima, infatti, che a livello mondiale sia la sesta malattia in ordine di rilevanza per l'uomo.⁵

In Italia i casi segnalati in medicina umana sono circa duecento ogni anno.⁶

Questa affezione può colpire diversi ospiti quali animali selvatici, il ratto nero, l'uomo ed il cane.

Quest'ultimo rappresenta il serbatoio della *Leishmania infantum*, parassita intracellulare, che si localizza e moltiplica all'interno delle cellule del sistema reticolo-endoteliale, determinando l'insorgenza di una patologia ad andamento generalmente cronico, definita Leishmaniosi Canina (CL)⁷.

Nell'uomo la diffusione di questa malattia in numerosi paesi della fascia equatoriale e sub-equatoriale, quali quelli dell'America latina⁸, dell'Asia e dell'Africa, è influenzata dalle condizioni climatiche e dalle condizioni socio sanitarie vigenti.⁹

Per tali motivi queste regioni rappresentano quelle maggiormente colpite dalla Leishmaniosi Umana.

Secondo l'OMS la popolazione globale a rischio d'infezione è di 350.000.000 di individui, l'incidenza annuale è di 1,5-2.000.000 di pazienti, di cui 1-1.500.000 di casi di Leishmaniosi cutanea, e 500.000 di Leishmaniosi viscerale.^{10 11}

In Italia¹² la Leishmaniosi è molto frequente lungo le aree costiere della Liguria, del Gargano, della Calabria, della Campania (Comuni Vesuviani) e delle isole,¹³ l'isola d'Elba,¹⁴ la Sardegna e la Sicilia¹⁵ sono le più colpite.

Per questo motivo in Campania,¹⁶ Sicilia e Liguria sono attivi, da tempo, piani di sorveglianza attiva.

3. La Leishmaniosi

3.1 Cenni Storici

La *Leishmania* venne isolata per la prima volta nel 1885 in India, da Cunningham, in persone affette dal “Bottone d’Oriente”.

Nel 1903, Marchand, osservò dei parassiti simili a quelli identificati da Cunningham, in strisci di milza di un cinese morto di “Kala-azar”.

Nello stesso anno, il protozoo fu anche isolato da Leishman (medico militare scozzese, in India), durante un’autopsia, dalla milza di un paziente; e da Donovan (a Madras in India), il quale, dopo un prelievo effettuato in vita dalla polpa splenica di un giovane indiano, individuò delle forme flagellate e sostenne che si trattava di microrganismi identici a quelli trovati nelle persone affette da Kala-azar.

Il primo a sospettare dell’azione dei flebotomi come vettori della malattia fu Pressat nel 1905.

La prima segnalazione di Leishmaniosi canina risale, invece, al 1908 grazie a Nicolle e Comte, in seguito si ebbero diverse segnalazioni sulla presenza di *Leishmanie* in altre specie animali.

In Italia, la malattia fu segnalata per la prima volta da Basile (1910), che identificò il parassita in un cane di Messina (Bordonaro), attribuendo a questa specie animale il ruolo di probabile serbatoio della Leishmaniosi umana.

Infine, nel 1941 Adler e Beer indussero sperimentalmente la malattia cutanea mediante la puntura di flebotomi infettati con *L. tropica*.

La patologia, tuttavia, è nota fin dall'antichità; se ne trova, infatti, un'attendibile descrizione, intorno a 2300 anni fa, in Assiria. E' sempre stata un'affezione molto nota ai medici arabi; ne parla Avicenna (filosofo e medico persiano, 980-1037) nel 1000 dopo Cristo nel suo famosissimo "Canone della Medicina", assai studiato in tutto il Medioevo.

3.2 Eziologia

Le specie di *Leishmania*¹⁷ conosciute sono oltre 18, e sono state differenziate grazie a tecniche di laboratorio (l'analisi elettroforetica degli isozimi, analisi del DNA, la valutazione degli anticorpi monoclonali), al comportamento, alla distribuzione geografica, alla patogenicità e alla sintomatologia di cui si rendono responsabili. (Tabella 1).

La maggior parte di queste è inquadrata in tre sezioni. (Tabella 2).

Tabella 1: Classificazione Phylum Protozoa

PHYLUM	SUBPHYLUM	CLASSE	ORDINE	FAMIGLIA	GENERE
Protozoa	Sarcomastigophora	Sarcodina	Kinetoplastida	Trypanosomadidae	Tripanosoma
		Mastigophora			Leishmania
	Sporozoa	Coccidia		Trichomonas	
		Piroplasmidia		Histomonas	
		Haemosporidia		Guardia	
				Hexamita	
	Ciliophora				
Microspora					

Tabella 2: Classificazione Leishmanie

HYPOPYLARIA	Leishmanie proprie dei sauri	Il protozoo si sviluppa nei flebotomi (sezione enterica posteriore) ed il contagio si realizza per ingestione di questi ultimi da parte dei sauri.
PERIPYLARIA	“ “ dei mammiferi e sauri	Il parassita si sviluppa nella sezione enterica posteriore del pappatacio, con migrazione nella parte enterica anteriore. Il contagio è permesso da una puntura sull'ospite.
SUPRAPYLARIA	“ “ dei mammiferi	Il microrganismo si sviluppa nella sezione media ed anteriore dell'insetto. Il contagio è permesso dalla puntura dell'ospite.

Le specie di interesse veterinario sono quelle il cui ciclo si svolge fra uomo, carnivori, roditori, marsupiali, ecc. da un lato, e flebotomi dall'altro.

Nella tabella 3 sono riportate le principali specie di leishmanie e la loro diffusione.¹⁸

Tabella 3: Classificazione Leishmanie (Solano – Gallego et al, 2009)

Geographical distribution of *Leishmania* species infecting dogs and their vector sand fly species.

<i>Leishmania</i> species	Geographical distribution	Proven sand fly vectors	Suspected sand fly vectors
<i>L. infantum</i>	Mediterranean basin Middle East	<i>Phlebotomus perniciosus</i> , <i>P. ariasi</i> , <i>P. perfiliewi</i> , <i>P. neglectus</i> , <i>P. langeroni</i> , <i>P. tobii</i> <i>P. kandelakii</i>	<i>P. longicuspis</i> , <i>P. syriacus</i> , etc.
	Southern Asia, Iran, Armenia, Afghanistan		<i>P. brevis</i> , <i>P. halepensis</i> , etc.
	Central Asia, China	<i>P. chinensis</i> , <i>P. alexandri</i>	<i>P. smirnovi</i> , <i>P. transcaasicus</i> , <i>P. Longiductus</i>
<i>L. infantum</i> = <i>L. chagasi</i>	Central and South America	<i>Lutzomyia longipalpis</i> , <i>Lu. evansi</i> , <i>Lu. olmeca olmeca</i>	<i>Lu. antunesi</i> , <i>Lu. shannoni</i>
<i>L. donovani</i>	East Africa	<i>P. orientalis</i> , <i>P. martini</i>	<i>P. rodhaini</i>
<i>L. tropica</i>	North Africa	<i>P. sergenti</i> , <i>P. arabicus</i>	<i>P. chabaudi</i> , <i>P. saevus</i>
<i>L. braziliensis</i>	Central to South America	<i>Lu. wellcomei</i> , <i>Lu. spinicrassa</i> , <i>Lu. whitmani</i> , <i>Lu. yucumensis</i> , <i>Lu. carrerai carrerai</i> , <i>Lu. llanosmartinsi</i> , <i>Lu. ovallesi</i> , <i>Lu. intermedia</i> , <i>Lu. gomezi</i> , <i>Lu. trapidoi</i> , <i>Lu. ylephiletor</i> , <i>Lu. umbratilis</i>	<i>Lu. amazonensis</i> , <i>Lu. migonei</i> , <i>Lu. panamensis</i> , <i>Lu. paraensis</i> , <i>Lu. complexus</i> , <i>Lu. pessoai</i> , etc.
<i>L. peruviana</i>	Peruvian Andes	<i>Lu. peruensis</i> , <i>Lu. verrucarum</i> , <i>Lu. ayacuchensis</i>	<i>Lu. noguchii</i> , <i>Lu. pescei</i>
<i>L. panamensis</i>	Central America	<i>Lu. trapidoi</i> , <i>Lu. ylephiletor</i> , <i>Lu. gomezi</i> , <i>Lu. panamensis</i> , <i>Lu. hartmanni</i>	<i>Lu. shannoni</i> , <i>Lu. ovallesi</i> , etc.

In Italia è presente il complesso *Leishmania infantum*, con le varianti enzimatiche (zimodemi) responsabili della Leishmaniosi umana (ZVL – forma viscerale e forma cutanea) e canina (CL).

In particolare, mediante la tipizzazione isoenzimatica, è stato possibile stabilire che nel cane responsabili dell'infezione sono lo zimodema Montpellier 1 (MON1) e talvolta lo zimodema MON72 (isolato soprattutto in animali dei comuni dell'area vesuviana).¹⁹

La *L. infantum* è stata isolata anche nelle volpi e nel ratto nero.

Non sembra però che tali animali incidano in maniera consistente sulla diffusione della malattia.

3.3 Ciclo biologico

Questo protozoo asessuato è un organismo dixeno che necessita di due ospiti per completare il proprio ciclo vitale²⁰ (schematizzato nella figura 3):

- un vertebrato (ospite definitivo), che rappresenta il serbatoio della malattia;
- un invertebrato (ospite intermedio), che rappresenta, invece, il vettore.

Si tratta, inoltre, di un microrganismo dimorfico, esiste infatti in più forme:

- ☞ amastigote (rotondeggiante, 2-5 μm , immobile, con protoplasma granuloso delimitato da plasmalemma tristratificato, con grosso nucleo centrale, e con bozzo di flagello – rizoplasto - dotato di un cinetoplasto periferico) presente all'interno delle cellule macrofagiche (cell. del sistema reticolo-istiocitario, monoliti, macrofagi, ecc.) dei mammiferi infettati (figura 1);
- ☞ promastigote (corpo stretto e lungo fino a 20 μm , con protoplasma granuloso, grosso nucleo, e con lungo e robusto flagello libero), nel vettore (figura 1.2);
- ☞ promastigote metaciclico (forma flagellata, con cinetoplasto vicino al nucleo) presente nelle cellule del vettore a livello della faringe, del piloro, e dell'ileo.

Una volta giunto nell'intestino del pappatacio, il protozoo, si trasforma in promastigote.

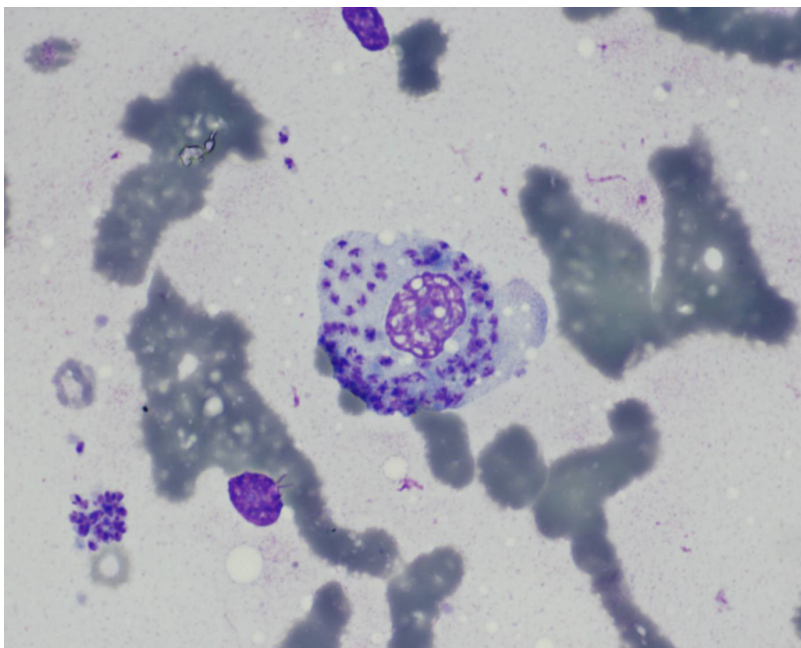


Figura 1. Leishmania - Amastigoti all'interno di un macrofago (1.250 x).

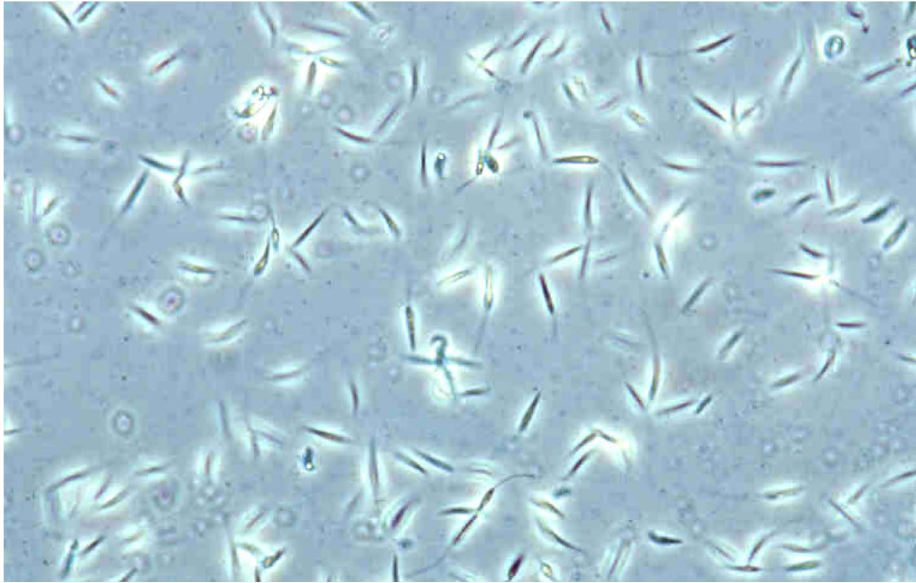


Figura 1.2
Leishmania
infantum-
Promastigoti in
coltura (contrasto
di fase, 1.250 x).

Il ciclo comincia nella femmina di flebotomo, quando questa compie il suo pasto su un soggetto infetto, è in questo modo, infatti, che assume anche le cellule del SRE, localizzate a livello cutaneo, contenenti gli amastigoti .

Gli amastigoti, ingeriti cominciano a trasformarsi lungo il tubo digerente in promastigoti e paramastigoti.

I promastigoti, poi, per scissione binaria si dividono ripetutamente e migrano nella parte anteriore dell'insetto, a livello della faringe, dove mutano in promastigoti metaciclici infettanti²¹.

Questi ultimi, dotati di notevole mobilità, si localizzano, successivamente, nella proboscide e vengono trasmessi ad un nuovo ospite nel momento in cui l'invertebrato compie un nuovo pasto di sangue.

Questa fase del ciclo dura dai 4 ai 20 giorni ed è influenzata dalla temperatura ambientale.

Una volta inoculati nell'ospite vertebrato, i promastigoti vengono fagocitati dalle cellule macrofagiche (monociti/macrofagi).

Questo accade perché si verificano:

- * un agganciamento alla cellula ospite tramite il flagello;

- * l'adesione del microorganismo (mediata da molecole di superficie del protozoo: lipofosfoglicano-lpg – glicoproteina gp63)²² alla membrana citoplasmatica;
- * l'interazione con i recettori di superficie specifici dei macrofagi.

Una volta penetrato nella cellula, il protozoo viene racchiuso in un vacuolo intracitoplasmatico, delimitato da una membrana fagosomiale, che, fondendosi con i lisosomi, si trasforma in un fagolisosoma.

All'interno di questi, probabilmente per una variazione di temperatura e per fattori ancora poco noti, il promastigote si trasforma in amastigote (2-5gg).

Quest'ultimo, infine, si moltiplica per scissione binaria fino a provocare la rottura del vacuolo parassitoforo.

In questo modo, liberatisi nel sangue, i protozoi possono colonizzare altre cellule e continuare ad esercitare la loro azione patogena.

Parte di queste cellule si localizza a livello del derma, oltre che nel sangue periferico, e viene assunta nuovamente dal vettore al momento della puntura.

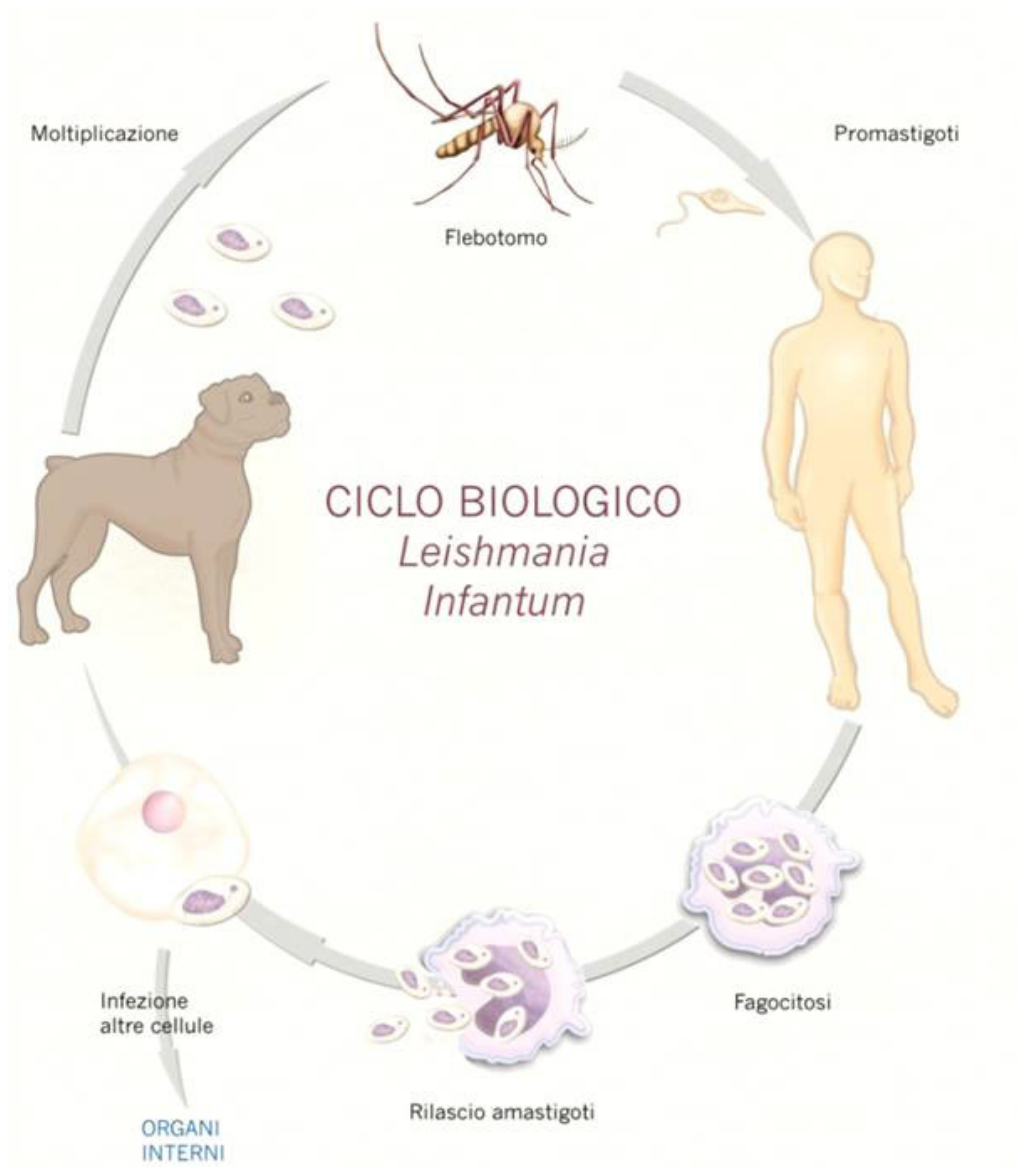


Figura 2. Ciclo biologico di *Leishmania* nell'ospite mammifero e nel flebotomo vettore.

3.4 Epidemiologia

La diffusione di questa patologia è influenzata da diversi fattori quali:

❖ l'ambiente

densità dei flebotomi, altitudine, caratteristiche geologiche del territorio, ecc.;

❖ il clima

temperatura, tasso di umidità, ecc.;

❖ le condizioni socio-sanitarie

malnutrizione, presenza di soggetti affetti da AIDS, elevata concentrazione di animali infetti, randagismo, ecc.;

❖ la mancanza di presidi immunizzanti efficaci sia per l'uomo sia per l'animale.

L'epidemiologia della *Leishmania* è legata al suo vettore,²³ e sta cambiando a causa delle modificazioni indotte dall'uomo e dall'ambiente, dell'immunodepressione e dell'aumento della mancata risposta ai trattamenti farmacologici.²⁴

La malattia può trasmettersi da cane a cane e più raramente da cane ad uomo.

In merito alla diffusione della patologia bisogna comunque ricordare che:

- il cane è il principale serbatoio del protozoo²⁵:
 - la categoria dei cani randagi ha un ruolo importante in alcuni Paesi del mediterraneo;
 - il serbatoio costituito dal cane domestico può essere controllato con opportuni interventi profilattici (limitazione della puntura dei flebotomi) e farmacologici (diminuzione della carica parassitaria);

- i carnivori (lupo, volpe) e i roditori selvatici (*Rattus rattus*) sono serbatoi naturali di gran lunga meno importanti per la persistenza dell'endemia.

Come già evidenziato, lo sviluppo del flebotomo esige in ogni caso determinate temperature e condizioni di umidità.

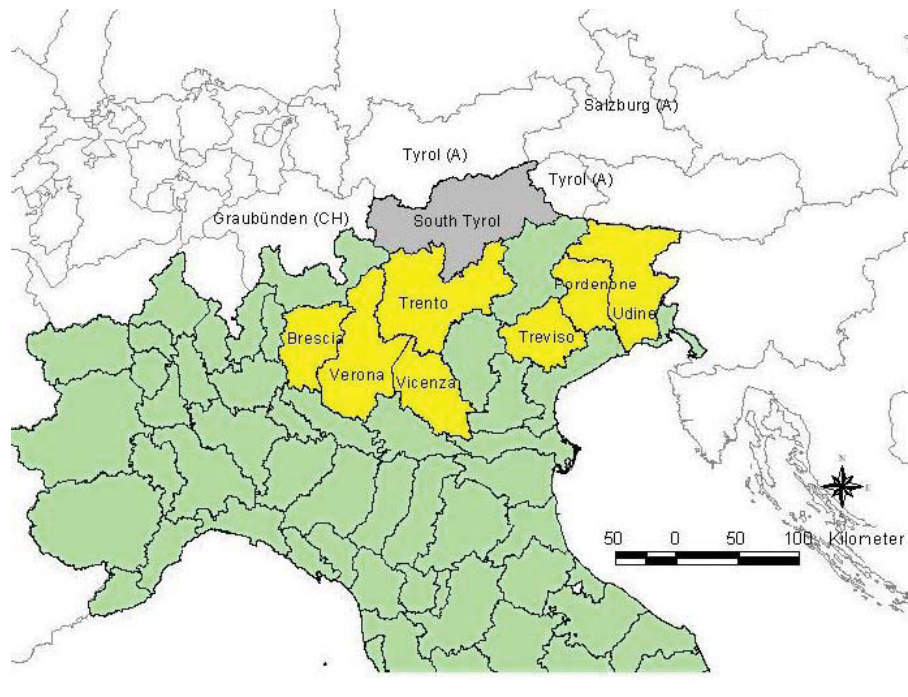
Nelle stagioni fredde, quindi, si trovano in diapausa; nelle zone a clima temperato la trasmissione ha, infatti, carattere stagionale.

La diffusione della patologia da aree endemiche ad aree indenni, a seguito dello spostamento dei cani “serbatoio” o a seguito dei cambiamenti climatici favorevoli allo sviluppo del vettore (focolai autoctoni), rappresenta un problema d’importanza rilevante, non solo in Italia.^{26 27}

A supporto di tale tesi anche il recente studio condotto nel nord Italia che dimostra come l’incidenza della ZVL in tali aree considerate in passato indenni è in costante aumento soprattutto a causa dei cambiamenti nella popolazione di flebotomi riscontrata, in maggioranza costituita dal *P. perniciosus* ed in misura minore da *P. neglectus* e *S. minuta*. In questa ricerca sono stati monitorati 175 siti in Piemonte, Valle d’Aosta, Veneto, Trentino e Lombardia, di questi 57 si sono rivelati positivi per la presenza, peraltro elevata, del *P. perniciosus*. Di rilevante importanza il dato riguardo la presenza del *P. neglectus* considerato un vettore di LV nell’area Mediterranea orientale e balcanica. Tali dati confermano il fatto che l’intera area è gradualmente divenuta endemica per Leishmaniosi.²⁸

Dato analogo è stato anche rilevato nel nord-est Italia (Friuli Venezia Giulia e Alto Adige) (Figura 3). In quest’area sono stati catturati 61 esemplari di flebotomi, il 62,3% di questi appartenenti alla specie *Sergentomyia minuta*, il restante 37,7% appartenenti alla specie *P. perniciosus*.²⁹

Figura 3 North-eastern Italian provinces with recent findings of CanL foci and Phlebotomus sand flies (in yellow). The study area is shown in grey. Da Morosetti 2009



La tabella che segue (tabella 4) compara i dati relativi alla raccolta dei flebotomi, presenti in letteratura, dell'area subalpina del nord-est Italia, con quelli della più recente ricerca effettuata da Morosetti et al (2009).

Region (reference)	No. of sand flies ^a (collection year)	Sand fly density (specimens/m ² sticky trap)		Species			
		No. of traps	Range by positive site	<i>P. perniciosus</i> (%)	<i>P. neglectus</i> (%)	<i>P. mascittii</i> (%)	<i>S. minuta</i> (%)
<i>Trentino</i>							
Ferrarese and Maroli, 2002	19 (2001)	366	1.2-8.3	32 (50.0)	25 (39.1)	0	7 (10.9)
Ferrarese et al., 2004	47 (2004)	156	1.3-6.2				
<i>Veneto</i>							
Cassini et al., 2007 ^b	45 (2005)	309	0.2- 2.3	117 (76.9)	18 (11.9)	0	8 (5.2)
	107 (2006)	524	0.1- 6.8				
<i>Friuli Venezia-Giulia</i>							
Cassini et al., 2007 ^c	9 (2005)	397	0.1-0.9	51 (89.4)	4 (7.0)	0	0
	48 (2006)	720	0.1-1.6				
<i>Lombardy</i>							
Maroli et al., 2006 ^a	230 (2005)	1113	0.3-24.5	22 (9.5)	66 (28.7)	22 (9.5)	120 (52.1)
<i>APB-ST</i>							
Present study	61 (2008)	943	0.5-5.8	23 (37.7)	0	0	38 (62.3)

^a Collections mainly performed by sticky traps, but also by CDC-light traps and indoor hand catches; ^bnine specimens from the 2 collecting years (5.9%) have been identified at *Phlebotomus* genus level only; ^ctwo specimens from the 2 collecting years (3.5%) have been identified at *Phlebotomus* genus level only.

Tabella 4: Morosetti et al, 2009.

L'esponenziale crescita della popolazione di flebotomi pare sia in parte dovuta sia alle migrazioni di breve distanza di questi ultimi dalle aree costiere mediterranee sia ad un'importazione accidentale.³⁰

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, dal 1993, l'area in cui la Leishmaniosi è endemica si è espansa notevolmente, così come è aumentato considerevolmente il numero di casi registrati.

Un importante contributo alla diffusione della malattia nell'uomo viene anche dalle proporzioni dell'epidemia di HIV in molte zone del mondo, patologia che favorisce la coinfezione con la *Leishmania*.

In Italia la popolazione a rischio ammonterebbe a circa 9.000.000 di persone, di cui 2.400.000 nella sola Sicilia. Nel nostro paese i casi accertati di ZVL, alcuni dei quali diagnosticati in pazienti HIV positivi, ammontano a circa 150-200/anno.^{31 32 33 34}

La maggior parte dei soggetti colpiti proviene da regioni endemiche centro-meridionali³⁵.

Le segnalazioni provenienti da zone in passato considerate indenni, come l'Italia settentrionale,^{36 37} debbono far intuire che non esistono zone che possano essere considerate completamente sicure; soprattutto alla luce dei cambiamenti climatici che si stanno verificando negli ultimi anni.

Le Leishmaniosi, comunque, al pari di altre malattie trasmesse da artropodi, sono sempre più una realtà dinamica governata sia da fattori bioclimatici sia da comportamenti umani, eventi, questi, che possono incidere notevolmente ed anche velocemente su ecosistemi parassita-vettore da sempre esistenti.

In conclusione in merito alla diffusione della Leishmaniosi, così come accade per tutte le malattie trasmesse da vettori, è possibile affermare che i fenomeni di globalizzazione, migrazione ed i cambiamenti climatici possono avere un grande

impatto. Soprattutto per quanto riguarda i meccanismi responsabili della diffusione della malattia in territori indenni costituiti, ad esempio, dall'immigrazione di un serbatoio infetto, dall'importazione di vettori infetti o di una nuova specie vettoriale.³⁸

3.4.1 Epidemiologia delle leishmaniosi zoonotiche da *Leishmania infantum* nel bacino del Mediterraneo

Nell'area mediterranea sono presenti due entità nosogeografiche della malattia causata da *L. infantum*:

1. Leishmaniosi viscerale zoonotica (ZVL), causata da ceppi viscerotropi del parassita;
2. Leishmaniosi cutanea sporadica (LCS), causata da ceppi dermatropi.

3.4.2 Leishmaniosi viscerale zoonotica

E' una grave sindrome sistemica a carico del sistema reticolo-endoteliale caratterizzata da febbre irregolare, epato-splenomegalia, anemia, leucopenia, piastrinopenia ed ipergammaglobulinemia. L'evoluzione in assenza di terapia è quasi inevitabilmente mortale.³⁹

La malattia è presente in maniera endemico-sporadica in tutti i Paesi mediterranei: Albania, Algeria, Bosnia-Erzegovina, Cipro, Croazia, Egitto, Francia, Giordania, Grecia, Israele, Italia, Libano, Libia, Malta, Marocco, Portogallo, Siria, Spagna, Tunisia e Turchia⁴⁰

(Figura 4).



Figura 4 Distribuzione della leishmaniosi viscerale zoonotica (LVZ) da *L. infantum* nell'area mediterranea e medio-orientale.

La LVZ è una tipica malattia rurale e peri-urbana strettamente legata alle caratteristiche ecologiche dei vettori. In tutti i paesi menzionati è presente in biotipi caldi, umidi e sub-umidi, ad una certa distanza dalla costa, preferibilmente in ambiente collinare. Al contrario essa è praticamente assente nelle pianure fredde (es. nord della Francia e della Spagna, Slovenia, *etc.*) o nelle aree montagnose al di sopra di 600-700 metri s.l.m.

A causa del limitato periodo di trasmissione compreso fra l'estate e il primo autunno, la LVZ mostra un andamento stagionale.

Il periodo di incubazione della malattia è variabile, i primi casi cominciano a comparire nel tardo autunno, mentre un picco viene raggiunto tra gennaio e marzo. Nel passato i casi di LVZ erano quasi esclusivamente descritti in bambini al di sotto dei due anni di età. Tuttavia negli ultimi 30 anni in alcuni paesi

sviluppati dell'area mediterranea (Italia, Francia, Grecia, Spagna e Portogallo) la malattia viene riportata più o meno nella stessa proporzione sia nei bambini sia negli adulti. Il fenomeno sembrerebbe essere attribuito ad un generale decremento dei livelli di immunità nella popolazione dovuto ad una diminuita intensità di trasmissione.⁴¹

I parassiti causa di LVZ appartengono alla specie *L. infantum*. Essa comprende numerosi zimodemi, ma il più comune è lo zimodema MON 1.

Alcune varianti enzimatiche sono state descritte nei pazienti immunocompetenti e nel cane nella zona campana (MON 72) ed in Sicilia e Sardegna (MON 27). Un'elevata eterogeneità degli zimodemi è stata invece riscontrata nei pazienti HIV+, rilevando una situazione genetica estremamente polimorfa nella specie *L. infantum*.⁴²

L'individuo HIV+ potrebbe essere un indicatore della reale struttura della popolazione parassitaria.

Il cane rappresenta il serbatoio principale della LVZ in cui la malattia manifesta una disseminazione viscerocutanea. La leishmaniosi canina (LCan) mostra grosso modo la stessa distribuzione della LVZ, tuttavia un'alta prevalenza di cani infetti può essere ritrovata in focolai con rarità o assenza di casi umani.

Questi animali sono un serbatoio ideale per il mantenimento e la diffusione della malattia. Serbatoi naturali potrebbero essere, inoltre, due mammiferi, il ratto nero (*Rattus rattus*) e la volpe (*Vulpes vulpes*).

La volpe è stata trovata infetta in Francia, Italia, Portogallo e Spagna. In questa specie la sintomatologia è simile a quella osservabile nel cane e anche la prevalenza di infezione sarebbe sovrapponibile a quella del cane (Mancianti et al, 1994), mentre il ratto nero è stato trovato occasionalmente infetto in Italia, Serbia e Spagna.⁴³

I vettori provati di *L. infantum* sono rappresentati da flebotomi appartenenti al genere *Phlebotomus*, sottogenere *Larroussious*. Il tasso di infezione naturale è molto basso, di circa 1-4% nei focolai più attivi.

Le due specie vettrici più importanti della LVZ nell'area mediterranea sono *P. perniciosus* e *P. ariasi* distribuite nel Mediterraneo occidentale e *P. neglectus* e *P. tobbi* distribuite nel Mediterraneo orientale.

Queste specie vivono usualmente in ambienti collinari ad una altitudine compresa tra i 100 e gli 800 metri s.l.m. e, come già detto, sono attivi solo durante i mesi estivi. *P. perniciosus* è largamente presente nella penisola italiana, soprattutto in Sardegna, Puglia, Sicilia e Toscana, predilige le aree rurali e periurbane, raramente le urbane ed è ugualmente adattabile in ambiente domestico, peridomestico e selvatico. Il suo ruolo come vettore è stato provato dall'isolamento di promastigoti di *L. infantum* zimodema MON 1 in molti paesi del bacino mediterraneo e dello zimodema MON 72 nell'area vesuviana ⁴⁴

3.4.3 Leishmaniosi cutanea sporadica

In molti paesi dell'area mediterranea la Leishmaniosi cutanea è causata esclusivamente da ceppi dermatropi di *L. infantum* (Francia, Italia, Malta, Portogallo e Spagna) ⁴⁵

(Figura 5).

Casi sono stati riportati anche in altri Paesi dove sono diffuse specie classicamente dermatrope come *L. major* e/o *L. tropica* (Algeria, Grecia e Tunisia). La malattia ha attualmente carattere sporadico con circa 100-150 casi segnalati annualmente per ciascun Paese. Ecologicamente la LCS da *L. infantum* mostra le stesse caratteristiche della LVZ, malattia tipicamente rurale peri-urbana che ha luogo in biotopi caldi, umidi e sub-umidi, lontani dal litorale, solitamente in aree collinose non al di sopra dei 600-700 metri s.l.m.



**Figura 5 Distribuzione della leishmaniosi cutanea sporadica da
L. infantum (LC) nell'area mediterranea.**

Il periodo di incubazione è generalmente lungo (a partire dai 6-7 mesi sino a più di un anno) e quindi un picco dei casi appare tra marzo e aprile.

La lesione, generalmente singola, può essere una semplice ulcera o assumere aspetto impetiginoso o erisipeloide.⁴⁶

Solo in pochi casi il parassita responsabile della LCS è indistinguibile isoenzimaticamente dal comune zimodema viscerotropo MON 1, nella maggior parte dei casi l'agente maggiormente rappresentato nelle aree endemiche è risultato essere lo zimodema MON 24. Vettori provati o sospetti di LCS sono *P. perniciosus*, *P. ariasi*, e *P. perfliewi*.

3.4.4 Epidemiologia della Leishmaniosi in Italia

3.4.4.1 Leishmaniosi umana

Da quanto esposto, in Italia sono presenti due soli tipi di Leishmaniosi: quella cutanea sporadica umana (LCS) causata da ceppi dermatropi di *L. infantum* e la viscerale zoonotica umana e canina (LVZ) causata da ceppi viscerotropi di *L. infantum*.

La LCS patologia rurale e peri-urbana ha una distribuzione, in generale, sovrapponibile alla LVZ, anche se non mancano importanti focolai “puri” della malattia, come quelle riscontrati in Abruzzo, in alcune zone della Calabria e del Nord della Sardegna.⁴⁷

L'ISTAT riporta 30-50 casi/anno di LCS, che rappresentano però una minima parte di quelli reali. Infatti solo nei focolai più attivi delle regioni sopra menzionate vengono diagnosticate oltre 100 casi annui.⁴⁸

La LVZ, maggiormente rappresentata nel territorio, è una tipica forma rurale/peri-urbana strettamente legata alle rigide caratteristiche ecologiche dei vettori. E' presente a focolai discontinui nella fascia tirrenica e nelle zone collinari ad ovest della dorsale appenninica, dalla Liguria alla Campania, fino ad una altitudine di 500-600 metri s.l.m. Nel versante orientale è diffusa nelle regioni costiere e sub-appenniniche, ioniche e adriatiche, fino all'Abruzzo, ed in tutte le isole maggiori e minori.

Focolai sporadici e di lieve entità sono invece riscontrabili nel medio e alto Adriatico e più in generale, ad est della dorsale appenninica dell'Italia centro-settentrionale. Il grafico 1 riporta l'andamento dei casi di LVZ umana negli ultimi quindici anni nelle regioni endemiche in Italia e nella sola Campania.

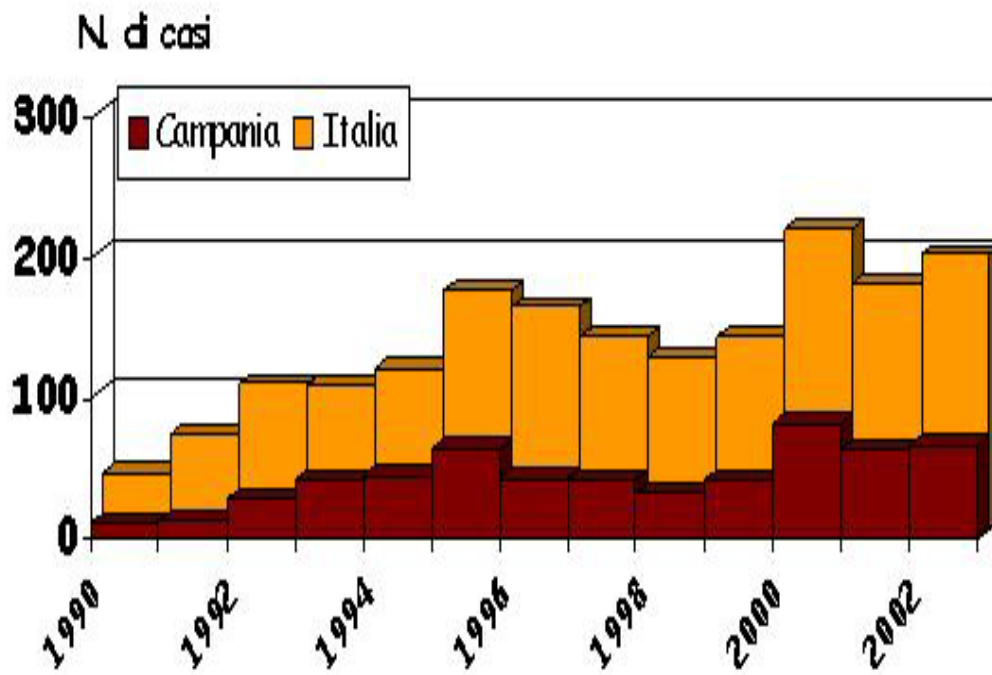


Grafico1. Incidenza della leishmaniosi viscerale umana nelle regioni endemiche italiane e nella sola Campania.

Nell'uomo la malattia ha un comportamento di tipo opportunistico interessando, in prevalenza persone in qualche modo immunodepresse.

Nell'area mediterranea la malattia era distribuita nelle zone più depresse, dove colpiva prevalentemente i bambini sotto i cinque anni di età con corredo immunitario ancora non del tutto sviluppato. Ora, invece, per i cambiamenti occorsi nella nostra società, interessa con la stessa frequenza adulti e bambini, ma prevalentemente soggetti che mostrano un calo delle difese immunitarie (sindrome da immunodeficienza acquisita [AIDS]⁴⁹, malattie croniche, terapie immunosoppressive).

3.4.4.2 Leishmaniosi canina

La leishmaniosi canina è endemica in Italia, ma all'interno del nostro Paese, così come in altri paesi europei, si possono identificare territori non endemici (dove

la malattia non è trasmissibile) e territori con endemia stabile o instabile. Queste condizioni sono influenzate dalla presenza e abbondanza nel luogo del flebotomo vettore, il quale influenza l'intensità di trasmissione del parassita in presenza di cani infetti. Le regioni endemiche sono quindi caratterizzate da focolai stabili di Leishmaniosi canina, con prevalenza di infezioni che possono essere molto alte, come nei focolai di Ustica (37%), monte Argentario (24%), isola d'Elba (19%), Imperia (30%), *etc.*, nei quali la trasmissione da cane a cane avviene regolarmente durante ogni stagione estiva;⁵⁰ e da focolai instabili (solitamente nelle vicinanze di aree stabili), nei quali casi autoctoni, generalmente pochi, sono documentati sporadicamente o periodicamente, ma non ogni anno (Gradoni, 1999).

Nelle aree endemiche inoltre, a causa delle specifiche esigenze ambientali del vettore, la Leishmaniosi presenta una distribuzione cosiddetta a “macchia di leopardo”; si alternano infatti microfocolai con alta e bassa prevalenza di infezione. Esempio concreto è dato dall'isola d'Elba, dove la prevalenza nella parte occidentale è appena del 2,5%, mentre quella del versante orientale è pari al 39,6%.⁵¹

Il diverso andamento epidemiologico è attribuibile inoltre alla capacità vettoriale della specie di flebotomo presente in una data area, infatti nelle zone con una frequenza di infezione bassa predomina la specie *P. perfiliewi* su *P. perniciosus*, vettore più competente per *L. infantum*.

Ancora un'importanza cruciale nell'andamento della trasmissione riveste il serbatoio e la sua capacità di infettare il vettore. In passato si pensava che solo gli animali sintomatici fossero capaci di trasmettere il parassita, grazie alla presenza di lesioni cutanee. Si è visto, invece, che l'abilità di infettare i flebotomi è simile sia per le forme asintomatiche sia per gli animali con differenti gradi della malattia, sebbene la percentuale di infezione dei vettori aumenti in presenza di cani marcatamente sintomatici.⁵²

Nell'ultimo decennio l'attenzione verso le Leishmaniosi è cresciuta e numerose ricerche sono state effettuate sui vari focolai; tuttavia ancora non si conosce l'esatta distribuzione e prevalenza dell'infezione nel cane in Italia.⁵³

Anche l'apparente aumento della diffusione della parassitosi riscontrata in questo ultimo periodo, in molti casi potrebbe essere un dato erroneo in quanto poco si conosceva in passato della situazione epidemiologica.

La distribuzione della malattia è oggi, comunque, evidenziata da una migliore conoscenza dei focolai presenti in zone storicamente endemiche, quali Campania, Sicilia, Sardegna, Toscana, Puglia e Liguria; e di focolai recenti presenti in regioni un tempo ritenute indenni, quali Veneto⁵⁴, Emilia-Romagna⁵⁵, Piemonte⁵⁶, Lombardia, Trentino e Valle d'Aosta⁵⁷. (Figura 6). Questi ultimi potrebbero essere il risultato della preesistenza di popolazioni vettoriali in concomitanza con l'introduzione nella zona di cani infetti.

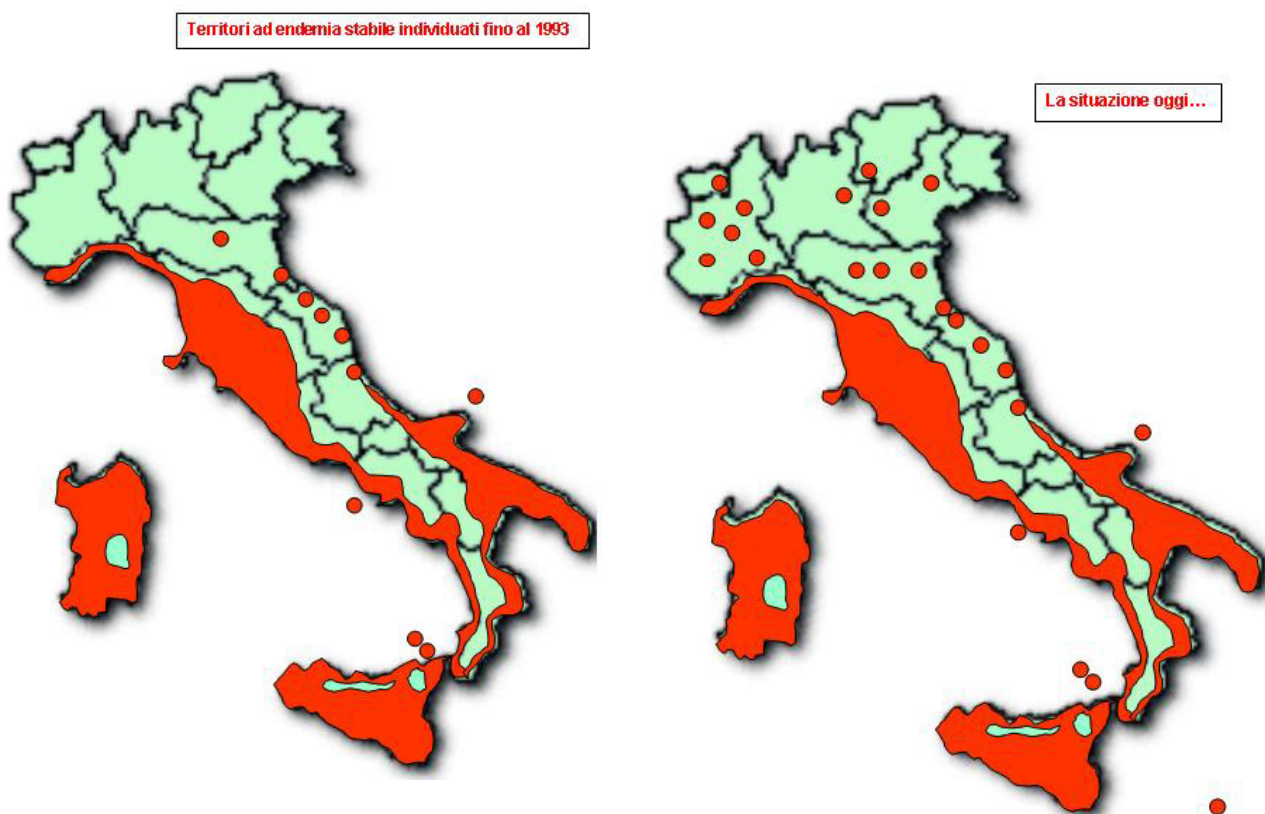


Figura 6 Distribuzione dei focolai di leishmaniosi canina segnalati in Italia dalle origini (1910) al 2004.

In un nuovo focolaio in provincia di Verona, la presenza del vettore è stata accertata, purtroppo, solo dopo la segnalazione dei casi endemici.⁵⁸

Mutate condizioni climatico-ambientali, idonee alla sopravvivenza del vettore, renderebbero più facile l'instaurarsi di focolai endemici stabili. Un'altra ipotesi considera, invece, lo stesso parassita già presente nella zona, anche se in forma ipoendemica e nei soli serbatoi selvatici; il cane diventa quindi, un epifenomeno che entra nel ciclo della malattia. Questo meccanismo è stato probabilmente alla base dello sviluppo dei casi autoctoni sporadici osservati in Emilia-Romagna nel periodo 1992-1997.⁵⁹

Conoscere l'esatta prevalenza, e quindi il numero dei cani infetti sul totale della popolazione canina nelle zone endemiche, è impossibile con gli attuali sistemi di sorveglianza. I metodi più usati considerano o la prevalenza della malattia conclamata, con una forte sottostima della reale diffusione dell'infezione; oppure la sieroprevalenza, che invece può dare una sovrastima della reale capacità del cane di infettare il flebotomo. Meglio sarebbe, quindi, considerare la capacità infettiva; si dovrebbe cioè poter evidenziare quei cani che, trovati positivi, sono anche capaci di infettare il vettore. In assenza di marcatori pratici ed affidabili, tuttavia, questo è possibile solo sperimentalmente e su scala ridotta, facendo nutrire i flebotomi su cani selezionati e poi andando a ricercare negli insetti i promastigoti.⁶⁰

Alla elevata prevalenza della Leishmaniosi canina fa riscontro un andamento sporadico della LV umana. La diffusione territoriale della patologia è sovrapponibile a quella della Leishmaniosi canina, ma l'andamento della malattia nell'uomo è caratterizzato da focolai ipoendemiche. Non mancano però brevi episodi epidemici, come il focolaio emiliano-romagnolo del 1971-1972, dove si evidenziarono 60 soggetti malati⁶¹ e l'attuale focolaio campano, dove ogni anno (da circa 10 anni) il numero dei pazienti aumenta costantemente. Quest'ultimo inoltre, è un focolaio particolare in quanto interessa soprattutto soggetti immunocompetenti adulti.⁶²

In conclusione per quanto riguarda il nostro territorio c'è da aggiungere che l'Italia si trova in una posizione particolare, è infatti, una zona fortemente endemica per Leishmaniosi, che subisce anche l'importazione di Leishmanie esotiche, per cui rappresenta un ponte est-ovest per le popolazioni di flebotomi vettori (infatti è possibile riscontrare specie "occidentali" come *P. ariasi* e *P. perniciosus*, ma anche di specie "orientali" come *P. perfiliewi* e *P. neglectus*).

È prospettabile, quindi che in un futuro non troppo lontano sia possibile assistere alla nascita di un altro ponte in direzione sud-nord, come ad esempio nel nord Africa dove sono presenti 4 diverse specie nosogeografiche di Leishmaniosi.⁶³

3.5 Vettore

Responsabile della trasmissione della malattia è il flebotomo (figura 7), un insetto ematofago, comunemente definito pappatacio, di piccole dimensioni (2-4mm), di colore giallo-biancastro, coperto da una fitta peluria e provvisto di lunghe zampe, il cui corpo presenta la particolarità di formare un angolo quasi retto.

I maschi si nutrono di succhi vegetali.

Le femmine, al contrario, sono dotate di strutture buccali atte a pungere, e necessitano del pasto di sangue per permettere la maturazione e la deposizione delle loro uova.

L'attività si realizza durante le ore notturne, con picchi intorno alla mezzanotte, a un'ora prima dell'alba e un'ora dopo il tramonto; durante la giornata riposano in zone ombreggiate (Killick-Kendrick).

Il ciclo vitale del flebotomo prevede quattro forme larvali e una pupale, ed è influenzato dalle condizioni climatiche (figura 8).

L'ambiente favorevole alla proliferazione di questi ditteri è caratterizzato da elevata temperatura, umidità relativa prossima alla saturazione, presenza di materiale organico ed oscurità; in inverno, infatti, subiscono una pausa per riattivarsi in estate, generando almeno due generazioni di insetti adulti.

Le specie conosciute sono oltre 800, e quelle più diffuse nel nostro territorio appartengono al genere *Phlebotomus*. (tabella 5) nel mondo i vettori comprovati di Leishmaniosi sono una settantina, e quattro di questi sono implicati nella trasmissione di *L. infantum* in Italia.⁶⁴

Tabella 5: Classificazione Phylum Arthropoda

PHYLUM	CLASSE	ORDINE	SOTTORDINE	FAMIGLIA	GENERE	SPECIE	DIFFUSIONE
<i>Arthropoda</i>	<i>Insecta</i>	<i>Diptera</i>	<i>Nematocera</i>	<i>Psychodidae</i>	<i>Phlebotomus</i>	<i>P.papatasi</i>	
						<i>P.argentipes</i>	
						<i>P.sergenti</i>	
						<i>P.perniciosus</i>	<i>Coste ioniche</i>
						<i>P.perfiliewi</i>	<i>Centro- sud</i>
						<i>P.major</i>	<i>Gargano</i>
					<i>Sergentomyia</i>	<i>S. minuta</i>	

Maroli et al. (1994)⁶⁵, dell'Istituto Superiore di Sanità, hanno esaminato i dati di 18 anni (tabella 6) di raccolta di flebotomi nei principali focolai di Leishmaniosi del centro e sud Italia e delle due isole maggiori, Sicilia e Sardegna.

Sono stati catturati 81.915 esemplari di cui:

- *P. perniciosus* (46,1%)
- *P. perfiliewi* (43,8%)
- *P. papatasi* (0,3%)
- *P. neglectus* (0,2%)
- *P. mascitti* (0,1%)
- *S. minuta* (9,5%)

Il *P. perniciosus* è una specie antropofila e zoofila e risulta reperibile sia in ambiente domestico (prevalenza 65,6%) sia in ambienti silvestri distanti dalle abitazioni (prevalenza 21,8%).

In Italia, tale specie è vettore provato della Leishmaniosi viscerale umana e della Leishmaniosi canina, e la sua espansione ha un'importanza rilevante,

epidemiologicamente parlando, in quanto è capace di diffondere la malattia da un focolaio all'altro.

Il *P. perfiliewi* è diffuso solo negli ambienti domestici con una prevalenza del 25,5% (se rilevata con trappole oleate) e dell'88,1% (se rilevata con trappole luminose); in ambienti selvatici la sua presenza è stata solo dello 0,5%.

Il *P. perfiliewi* è il vettore più probabile della Leishmaniosi cutanea dell'uomo (Maroli et al., 1987).

Il *P. neglectus*, risultato poco diffuso e presente in Puglia, Calabria e Sicilia, è sospettato di trasmettere la Leishmaniosi viscerale e la Leishmaniosi canina.

I *Perniciosus* e *Perfiliewi* sono abbondantemente diffusi in Campania, in particolare nelle zone ritenute endemiche per la Leishmaniosi, quali quelle del versante Vesuviano che si affacciano sul golfo di Napoli, dell'area Flegrea, di tutta la penisola Sorrentina e Amalfitana, in gran parte delle province di Salerno, di Caserta e delle isole di Procida, Capri e Ischia.

Questi insetti sono presenti dalla primavera all'autunno lungo tutta la costa della penisola fino a 600-800m sul livello del mare, e fino a 20km di distanza dal mare.

Il loro volo, però, è di breve durata ed estensione, 2-3km al massimo, ed è disturbato dal vento e dalle temperature al di sotto della media estiva. La velocità è di 0.60-0,70 m/sec.

In merito ai cambiamenti della fenomenologia dell'infezione da *Leishmania*, Maroli ha recentemente affermato che fondamentale per la comprensione della migrazione dei vettori, dalle aree rurali a quelle periurbane ed urbane, è l'intervento dell'uomo. L'urbanizzazione, l'attuazione di numerose opere nelle

zone rurali (dalle grandi dighe alla massiccia deforestazione, alla trasformazione in senso agroindustriale di numerose aree), e l'aumento della densità abitativa delle città a scapito della campagna, pare abbiano notevolmente influito su tali eventi.

In un suo studio, infatti, l'Autore ha dimostrato che l'insetto non punge specifici ospiti, ma che la sua scelta dipende soltanto dalla "disponibilità" di questi ultimi: cavalli, pecore, gatti, piccioni, polli, oche, tacchini, conigli, costituiscono una gradita fonte di sangue per i flebotomi, tanto quanto cani ed uomini.



**Figura 7: Femmina di
Phlebotomus perniciosus
durante un pasto di sangue.**

**Figura 8: Ciclo di sviluppo dei
flebotomi**

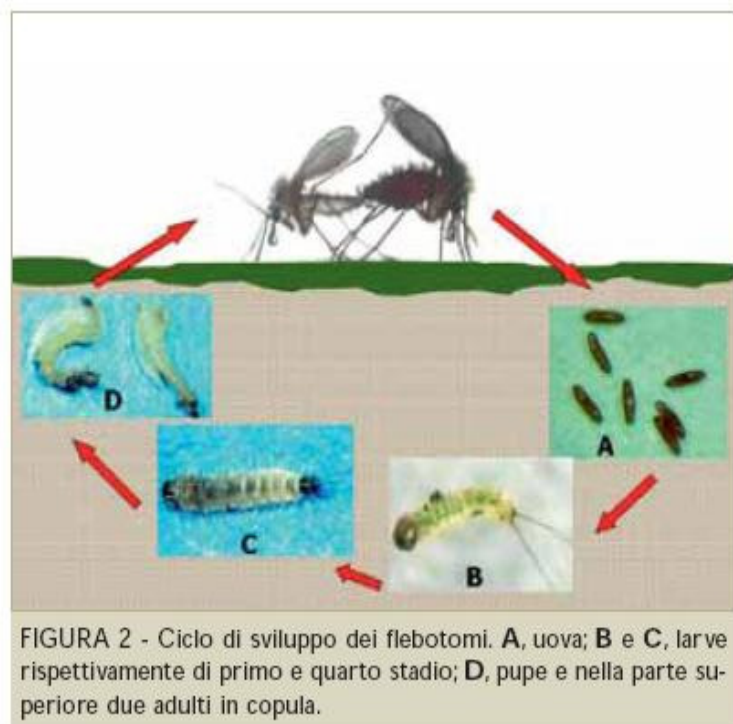


Tabella 6: Frequenza delle specie di flebotomi raccolti per regione (Maroli et al., 1994)

Regione	Insetti raccolti	<i>P.perniciosus</i>	<i>P.perfiliewi</i>	<i>P.neclectus</i>	<i>P.papatasi</i>	<i>P.mascitti</i>	<i>S.minuta</i>
Abruzzo	3742	446	2735	0	1	12	548
Calabria	3888	534	1802	46	3	0	1503
Campania	2716	1791	0	0	2	15	
Emilia Romagna	174	0	174	0	0	0	0
Lazio	700	492	15	0	140	2	51
Marche	14945	40	14905	0	0	0	0
Molise	10	0	7	0	0	3	0
Puglia	5822	5349	15	56	126	1	275
Sardegna	29911	25735	1324	0	0	0	2852
Sicilia	5048	972	3723	27	0	0	326
Toscana	14959	2449	11199	0	9	3	1299
Totale	81915	37808	35899	129	281	36	7762
%	100	46,1	43,8	0,2	0,3	0,1	9

Studi più recenti confermano la presenza e l'aumento della diffusione del vettore nel nostro territorio, sia per quanto riguarda il centro-sud Italia sia il nord.^{66 67}

3.6 Modalità di contagio

La trasmissione della malattia può avvenire per contatto indiretto o più raramente per contatto diretto, tuttavia bisogna osservare che altre vie di trasmissione senza l'intervento di un vettore siano ipotizzate da tempo.

3.6.1 Indiretto

- da cane malato a cane sano mediante puntura del flebotomo;
- da cane malato ad uomo mediante puntura del flebotomo;
- per possibile ingestione/schiacciamento linguale di flebotomi parassitati (ipotesi mai definitivamente confermata).

3.6.2 Diretto

- attraverso scambio di sangue⁶⁸ (donatori), specialmente in soggetti immunocompromessi (ipotesi dimostrata solo sperimentalmente);
- mediante ferite/morsi tra cane infetto e cane sano (ipotesi mai dimostrata definitivamente)
- contagio durante il coito (ipotesi dimostrata solo sperimentalmente)⁶⁹;
- trasmissione trans-placentare⁷⁰ madre→figlio (ipotesi dimostrata solo sperimentalmente).
- Non esistono prove di trasmissione diretta attraverso la saliva o essudati congiuntivali.
- E' utile sottolineare che le vie di trasmissione diretta, allo stato attuale, non sembrano particolarmente rilevanti nella diffusione dell'infezione.

3.7 Patogenesi

Il meccanismo patogenetico ha inizio nell'ospite nel momento in cui i promastigoti vengono inoculati dal vettore, attraverso la saliva, durante il pasto di sangue.

Il sito primario d'infezione è, infatti, rappresentato dalla cute.

Nel luogo in cui avviene la puntura può manifestarsi una reazione locale, pruriginosa, con la formazione di una papula che può persistere per alcune settimane.⁷¹

L'incubazione può durare da 1 mese a 4 anni.

Molti di questi promastigoti, nel sito di inoculazione, muoiono dopo essere stati attaccati dai fluidi tossici e dalle componenti difensive del siero (C') presenti nel derma.

Quelli che riescono a sopravvivere, invece, vengono fagocitati dai macrofagi, all'interno dei quali si trasformano in amastigoti, e cominciano a moltiplicarsi.

Le manifestazioni cliniche della malattia sono legate alla capacità degli amastigoti di sopravvivere nei macrofagi e di disseminarsi nell'organismo resistendo a quelli che sono i meccanismi di difesa dell'ospite. Queste proprietà suggeriscono sia l'esistenza di strategie proprie del parassita, che gli consentono di eludere le reazioni della difesa immunitaria, sia di fattori legati ad una risposta cellulo-mediata non idonea dell'ospite.

I macrofagi parassitati, infatti, se opportunamente stimolati dai linfociti T helper, sarebbero in grado di elaborare fattori tossici (enzimi lisosomiali, metabolici dell'O₂, superossido di idrogeno, perossido di H, ossido di azoto) per la *Leishmania*.

I meccanismi messi in atto dal protozoo al fine di garantire la propria sopravvivenza nell'organismo ospite sono:

1. **L'abilità di evitare l'attività citolitica del Sistema Complemento.**^{72 73}
2. **La capacità di farsi proteggere dalla cellula colonizzata.**⁷⁴
3. **La predisposizione ad evadere i meccanismi della fagocitosi mediante:**
 - ❧ l'induzione di un burst respiratorio ridotto,⁷⁵
 - ❧ l'azione del lipofosfoglicano inibente la proteinchinasi C,⁷⁶
 - ❧ l'azione protettiva della glicoproteina 63 capace di neutralizzare gli enzimi proteolitici,⁷⁷
 - ❧ l'azione dal glicoinositolfosfolipide,⁷⁸
 - ❧ la trasformazione da promastigote ad amastigote, forma più resistente,⁷⁹
 - ❧ il blocco della produzione dell'ossido nitrico,
 - ❧ l'inoculazione del protozoo in un distretto anatomico in cui la temperatura, inferiore a quella corporea, influisce negativamente sull'attività dei macrofagi.⁸⁰
4. **La proprietà di inibire la presentazione dell'antigene.**
5. **La possibilità di influenzare le citochine dell'ospite.**
6. **Il potere di modulare l'azione dei linfociti T inducendoli a produrre dei T helper non protettivi.**⁸¹

L'esito dell'infezione è correlato al tipo di risposta immune che viene innescata. Sperimentalmente è stato possibile riconoscere animali geneticamente recettivi ed animali geneticamente resistenti.

Negli animali di laboratorio resistenti all'infezione si è constatato che i meccanismi immunitari, che l'organismo mette in atto per difendersi, sono rappresentati dalla risposta cellulo-mediata di tipo Th1.^{82 83}

A questa risposta fanno seguito la liberazione di interleuchina-2 (IL-2) capace di stimolare la proliferazione degli altri linfociti T, e la liberazione di interferone gamma (IFN) in grado sia di attivare i macrofagi, che in questo modo

elaborano IL-12, sia di favorire la proliferazione dei Th1 inibendo quella dei Th2.

Negli animali sensibili, al contrario, la risposta è di tipo Th2, con produzione di IL-4 e IL-10 (fattori capaci di sopprimere l'attività dei Th1 e dei macrofagi), e stimolazione di linfociti B (con conseguente produzione di immunoglobuline).⁸⁴ In questi soggetti, inoltre, i segni clinici sono molto evidenti, i titoli anticorpali molto alti (>1:320), ed il profilo protidoplasmatico alterato (iperproteinemia, iperglobulinemia, inversione rapporto albumine/globuline).

La stimolazione umorale indotta dai linfociti B non è protettiva, in quanto gli anticorpi prodotti non sono capaci di neutralizzare il protozoo.

Al contrario, quest'ultimo è in grado di opporsi alla loro azione agganciandoli ad antigeni di superficie ed eliminandoli sottoforma di immunocomplessi.

Anche nella popolazione canina esistono due classi di soggetti,⁸⁵ ognuna delle quali reagisce diversamente all'infezione. Il controllo e l'evoluzione della malattia dipendono, infatti, dalla stimolazione dei diversi linfociti T (CD4+⁸⁶, CD8+) responsabili del riconoscimento degli antigeni e dell'attivazione dell'immunità cito-mediata.

In alcuni di essi, come succede per le cavie, nel momento in cui il protozoo viene introdotto nel derma, possono difendersi provocando una drastica riduzione del numero dei parassiti mediante l'attivazione dei linfociti Th1 (IL-2, IFN).

Questa possibilità si traduce in una buona risposta cellulo-mediata, capace di proteggere l'organismo, e responsabile di un'evoluzione benigna dell'infezione.

In altri, viceversa, si verifica un'attivazione dei linfociti Th2 (IL-4 e 5 BSF-1) con conseguente stimolazione dei linfociti B cui fa seguito un'elevata produzione di anticorpi aspecifici e non.

Tale stimolazione, inoltre, porta ad una produzione di anticorpi diretti anche contro strutture “self”, instaurando degli eventi autoimmunitari, che sono alla base di gran parte dei fenomeni patologici che si ritrovano in animali affetti da *Leishmania* (nel cane sono stati evidenziati Ac-anti nucleo (ANA-test), Ac-anti muscolo liscio, cardiaco ed anti-eritrociti ed il fattore reumatoide).

Questo tipo di risposta non protegge l’organismo dall’aggressione del protozoo, ma favorisce il richiamo, nel sito d’infezione, di macrofagi immaturi a basso potenziale antiparassitario.

Ciò si traduce in un’evoluzione maligna della malattia dovuta sia alla protezione delle *Leishmanie* all’interno dei macrofagi sia alla loro diffusione sistemica.

Non sono noti i meccanismi per cui la risposta è di tipo Th1 o Th2, ma l’ipotesi più accreditata prende in considerazione la modalità di presentazione dell’antigene.

Negli animali sensibili alla malattia, la *Leishmania* è rinvenibile all’interno dei macrofagi nei tessuti ed organi di tutto l’organismo, eccezionalmente del sistema nervoso centrale.^{87 88}

I parassiti, al riparo nei fagociti, sollecitando continuamente le cellule immunocompetenti causano uno squilibrio del sistema immunitario.

Questo continuo contatto fra l’antigene e le cellule difensive caratterizza l’evoluzione della malattia che si accompagna a:

↪ iperglobulinemia

- dovuta alla continua stimolazione dei linfociti B che provocano l’incremento delle proteine totali e l’inversione del rapporto albumine/globulina;

↪ produzione di auto-anticorpi

- causata dalla reazione crociata fra antigeni parassitari ed antigeni *self* e responsabile dell’insorgenza di anemia e di trombocitopenia⁸⁹;

↪ produzione e deposito di immunocomplessi

- responsabili di vasculite, glomerulonefrite e poliartrite.

Per quanto riguarda le lesioni cutanee, la patogenesi non è stata del tutto chiarita, secondo alcuni autori potrebbe dipendere da:

- ⌘ un'infiltrazione di cellule infiammatorie nel derma⁹⁰, dovuta alla presenza del parassita nel macrofago;
- ⌘ un deposito di immunocomplessi;
- ⌘ fenomeni di vasculite.

3.8 Sintomatologia

La Leishmaniosi canina è una malattia sistemica cutaneo-viscerale caratterizzata da un quadro clinico polimorfo, dove ogni cane manifesta una propria combinazione dei diversi segni clinici o anche uno solo di questi. La sintomatologia è caratterizzata prevalentemente da una forma cronica, che può essere oligosintomatica (con interessamento di uno o più linfonodi, perdita di peso e anemia di modico grado) o francamente sintomatica (linfadenomegalia, splenomegalia, eczema furfuraceo associato ad ulcere cutanee, onicogrifosi, grave anemia, epistassi, lesioni oculari, compromissione epato-renale).⁹¹

I segni clinici maggiormente rilevati sono quelli cutanei e la linfoadeopatia, sono però anche rilevabili una vasta gamma di altri segni e lesioni.^{92 93}

Nonostante il contagio si verifichi nei periodi caldi (maggio – ottobre), nei quali la concentrazione dei flebotomi è alta, le manifestazioni cliniche della Leishmaniosi possono comparire in qualsiasi stagione dell'anno; il periodo di incubazione può infatti essere di alcuni mesi fino a tre anni ed oltre.

In base alle caratteristiche sintomatologiche, alla risposta immunitaria e, alla carica parassitaria, in passato si distinguevano 4 classi di soggetti:⁹⁴

- asintomatici;
- oligosintomatici;
- sintomatici;
- spiccatamente sintomatici.

Oggi, grazie alle recenti acquisizioni ai fini diagnostici e terapeutici si preferisce differenziare i soggetti in sei stadi⁹⁵:

1- cani esposti o con infezione sub-patente: sono inseriti in questa categoria i cani con bassi titoli anticorpali, asintomatici e negativi ad esami cito-istologici, parassitologici e molecolari, di solito i soggetti in questione hanno soggiornato in territori endemici. I cani in questo stadio non necessitano di alcuna terapia, ma devono essere monitorati sierologicamente per 2-4 mesi dal riscontro delle prime anomalie;

2- cani con infezione patente asintomatici: questa categoria comprende i cani, sempre asintomatici, in cui il titolo anticorpale è basso ma è stata dimostrata la presenza del parassita mediante esami diretti (es. microscopico, coltura, PCR).

Nelle aree endemiche, però, il riscontro della positività alla PCR, su cute o sangue periferico, in assenza di lesioni, può non essere sufficiente per considerare un cane come infetto;

3- cani con infezione patente sintomatici: appartengono a questa categoria i soggetti che hanno elevati titoli anticorpali, positività agli esami diretti, e che mostrano uno o più segni clinici comunemente riscontrati nella leishmaniosi del cane. I cani in questo stadio necessitano di una terapia anti-*Leishmani*;

4- cani gravemente malati: cani infetti con grave quadro clinico che non rispondono alla terapia anti-*Leishmania*, o nefropatici, o affetti da insufficienza renale cronica, o con malattie concomitanti ingravescenti (oculari, articolari) che richiedono una terapia immunodepressiva, o infine, gravi malattie concomitanti di natura neoplastica, endocrina o metabolica;

5- cani malati che non rispondono al trattamento specifico anti-*Leishmania*;

6- cani malati trattati ma con recidiva precoce.

Nel cane si riconoscono due forme di Leishmaniosi considerate fasi evolutive della stessa malattia (forma generalizzata):

1. L. viscerale;

2. L. cutanea.

Nei soggetti colpiti, la patologia può avere un andamento lieve e benigno, oppure un andamento grave e mortale che può decorrere in forma acuta (rara), sub-acuta, cronica.

Le forme acute⁹⁶, che possono durare pochi giorni ed esitano nella morte del soggetto, si caratterizzano per un coinvolgimento del Sistema Nervoso.

Si osservano generalmente in cani giovani (6 mesi – 3 anni) con:

- febbre iniziale;
- astenia;
- dimagrimento;
- aumento di volume dei linfonodi esplorabili;
- enteriti;

Nelle forme croniche tipiche i sintomi,⁹⁷
⁹⁸ ⁹⁹ schematizzati nella tabella 7,
 osservabili sono molteplici, possono
 coinvolgere diversi apparati o organi.¹⁰⁰
 L'animale colpito può presentare uno o
 più segni contemporaneamente.

All'esame obiettivo il mantello è opaco
 e le condizioni generali precarie, alcuni
 cani manifestano cachessia,
 debilitazione e debolezza.

Molti soggetti dimagriscono, in molti
 casi nonostante l'aumento dell'appetito,
 e la perdita di peso si accompagna ad
 ipotonia e ipotrofia muscolare.

L'anoressia in genere si accompagna
 all'insufficienza renale, così come la
 poliuria e la polidipsia.

Tabella 7: Paltrinieri et al. 2010

Reperti clinici generali e specifici di particolari distretti dell'organismo in corso di LCan	
Generali	Stato di nutrizione scadente fino alla cachessia Ipotrofia muscolare Letargia Pallore delle mucose Epistassi Aumento di volume da lieve a moderato dei linfonodi esplorabili Epistassi Epato-splenomegalia Zoppie e tumefazioni articolari Febbre
Cutanei e muco-cutanei	Dermatite desquamativa (localizzata/generalizzata) Dermatite ulcerativa con aspetto e distribuzione variabili Giunzioni muco-cutanee Cute che ricopre le estremità Sedi sottoposte a trauma Dermatite papulare Dermatite nodulare Lesioni nasali simil-lupus/pemfigo Onicopatie Ipercheratosi naso-digitale
Oculari	Lesioni palpebrali: vedi reperti cutanei e mucocutanei Lesioni congiuntivali diffuse e/o nodulari. Lesioni corneali per lo più associate a quelle congiuntivali (cheratocongiuntivite). Presenti anche forme di cheratite nodulare e di cheratocongiuntivite secca. Lesioni della sclera: episclerite e sclerite diffusa e/o nodulare. Lesioni dell'uvea anteriore diffuse e/o granulomatose e lesioni dell'uvea posteriore (corioretiniti, emorragie e distacchi retinici). Possibili complicanze delle forme uveali, il glaucoma e la panoftalmite. Lesioni orbitali granulomatose, miositi dei muscoli estrinseci.
Altri	Gastrointestinali, neurologici, ecc.

La febbre è presente quando compaiono delle infezioni concomitanti (ehrlichiosi, babesiosi, infezioni batteriche secondarie).

Le mucose appaiono pallide a causa dell'anemia e della piastrinopenia, spesso dovute a fenomeni autoimmunitari (maggior distruzione da parte della milza).

La linfadenopatia rende i linfonodi esplorabili ingrossati, duri, spostabili e non dolenti, è dovuta ad un'ipertrofia delle regioni corticali e midollari dei linfonodi in cui si rinvencono macrofagi carichi di amastigoti, numerose plasmacellule e cellule di Mott.^{101 102 103}

L'epatosplenomegalia è un reperto incostante, e l'insufficienza epatica è stata descritta in alcuni casi.

L'atrofia muscolare¹⁰⁴, soprattutto dei muscoli facciali e temporali conferisce all'animale l'aspetto di "cane vecchio".

L'onicogrifosi (causata dalla reazione proliferativa della matrice ungueale conseguente alla presenza dei parassiti) e l'ipercheratosi digitale possono essere responsabili di zoppie, altresì provocate da polimiositi e artrosinoviti, quest'ultime legate ad un deposito di immunocomplessi a carico della membrana sinoviale, si caratterizzano per una zoppia intermittente e migratoria.

L'epistassi è unilaterale ed intermittente, e pare sia provocata sia da un'alterazione della diatesi^{105 106} (dovuta all'iperglobulinemia, all'ipoalbuminemia, alla trombocitopenia ed alla vasculite da immunocomplessi) sia da lesioni emorragiche ed ulcerative a carico delle mucose nasali.

Le lesioni oculari rappresentano un'espressione clinica della malattia frequente nelle aree endemiche e sono la conseguenza dell'azione diretta del parassita e della risposta immunitaria dell'ospite, pare infatti, che l'azione del parassita si

renda responsabile dell'insorgenza di granulomi infiammatori locali o infiltrativi.^{107 108 109}

Le lesioni sono spesso rappresentate dalla blefarite, dalla congiuntivite cronica o dalla congiuntivite nodulare con raccolta di essudato muco-purulento nel sacco congiuntivale, da cheratite, sclerite, uveite anteriore e posteriore, cellulite orbitale, miosite dei muscoli extraoculari, e da complicazioni secondarie quali il glaucoma e l'endoftalmite.¹¹⁰ I casi gravi possono essere caratterizzati da una



cheratocongiuntivite accompagnata da un opacamento corneale.¹¹¹

L'infiammazione della camera anteriore dell'occhio (figura 9), molto frequente in corso di Leishmaniosi canina, può essere di due forme, una è dovuta all'azione degli

Figura 9 Uveite

immunocomplessi, e può provocare anche la formazione di un edema corneale e di un glaucoma, l'altra ha carattere granulomatoso e rende la superficie iridea irregolare. Nei casi particolarmente gravi è possibile la comparsa di panofthalmiti ed endofthalmiti, con coinvolgimento di tutte le strutture oculari, tale evenienza comporta nel tempo la perdita della visione.

La localizzazione oculare della *Leishmania* può essere evidenziata da esami molecolari, citologici, ed immunoistochimici realizzabili su prelievi dalle strutture interessate (congiuntivale, sclerale, corneale, iridea).¹¹²

La diarrea ed il vomito possono essere provocati da una colite cronica o da una sindrome uremica terminale.

Le lesioni cutanee^{113 114 115} macroscopiche o microscopiche descritte in corso di Leishmaniosi cutanea, sostenuta da *Leishmania infantum*, possono essere:

▲ dermatite desquamativa;

- ♣ dermatosi ulcerativa;
- ♣ dermatite nodulare;
- ♣ dermatite papulare;
- ♣ paronichia;
- ♣ onicogrifosi;
- ♣ ipercheratosi nasale;
- ♣ ipercheratosi cuscinetti plantari.

Queste alterazioni sono di natura cronica, simmetrica e non pruriginosa, e rappresentano nelle aree endemiche il motivo principale che induce il proprietario a far visitare l'animale

La forma più frequente e caratteristica della malattia è l'esfoliativa, una dermatite non suppurativa, localizzata, regionale, o generalizzata che si presenta principalmente a livello della testa, della regione perioculare, dei padiglioni auricolari, del dorso e degli arti posteriori, tale forma si accompagna a scaglie pitiriasiformi o psoriasiformi, più o meno aderenti alla cute, associate ad eritema iperpigmentazione xerosi, ipotricosi, alopecia o con presenza di pelo opaco secco fragile o oleoso.¹¹⁶

Queste manifestazioni sono il risultato di un'efficace risposta immunitaria locale.¹¹⁷

Lesioni ulcerative, frequenti in corso di CanL, hanno forma irregolare, possono presentarsi singole o multiple, ben demarcate e profonde con margini frastagliati e circondate da cute eritematosa con ipotricosi o alopecia; refrattarie a qualunque trattamento locale, possono localizzarsi a livello dei padiglioni auricolari, dei cuscinetti plantari, delle narici, del tartufo, delle giunzioni mucocutanee,¹¹⁸ delle zampe, della coda, possono interessare anche gli arti soprattutto a livello delle prominenze ossee.

Tali manifestazioni sono conseguenti al rilascio di parassiti nel derma, al trauma locale ed al danno vascolare.¹¹⁹

Nel pazienti affetti da CanL, oltre ai segni clinici descritti si possono osservare altre lesioni atipiche, come la dermatite da leccamento delle estremità,¹²⁰ depigmentazione nasale, pannicolite, blefarite ulcerativa,¹²¹ ecc; nonché alterazioni dovute alla predisposizione che la malattia induce e che determinano l'insorgenza di demodicosi generalizzata, dermatite atopica, infezioni secondarie (piodermite stafilococcica).

Nei soggetti colpiti da *L. tropica* è riscontrabile una forma cutanea della malattia, dovuta all'inoculazione nel derma del parassita, da parte del dittero ematofago, che si localizza e moltiplica nei macrofagi lì presenti.

Nelle aree interessate, infatti, è possibile rinvenire dei noduli circoscritti, indolori, grossi fino ad una noce, che successivamente tendono ad ulcerarsi.

Le ulcere non guariscono facilmente.

La malattia può regredire spontaneamente in alcuni mesi.

Infine, di rilevante importanza, è la glomerulonefrite membrano-proliferativa cronica,^{122 123} sempre dovuta all'azione degli immunocomplessi,¹²⁴ che può portare fino all'insufficienza renale cronica, la prima causa di morte degli animali colpiti dalla malattia.

Tali alterazioni meritano un particolare cenno in virtù del fatto che circa il 50% dei cani colpiti dalla malattia presenta un interessamento renale,¹²⁵ (30% insufficienza renale – 20% glomerulopatia) più o meno grave, che viene espresso da:

- ♦ ipoalbuminemia (può dipendere anche dall'enteropatia proteinodisperdente, dai processi flogistici, e dalla diminuita sintesi epatica);
- ♦ proteinuria di tipo misto,¹²⁶ tubulare e glomerulare: è una proteinuria molto precoce rilevabile prima dell'aumento della creatininemia e dell'uremia, ed è proporzionale al danno renale. Questo tipo di esame andrebbe effettuato

sistematicamente, grazie alla sua sensibilità, come marker precoce di danno renale;

- ♦ presenza di cilindri granulosi e/o cerei nelle urine;
- ♦ poliuria-polidipsia (indicano un danno renale del 75% dei glomeruli);
- ♦ aumento della creatininemia (indice di filtrazione renale) e dell'uremia (il persistere di questi tassi elevati, nonostante un'idonea ed adeguata terapia, ha valore prognostico infausto);
- ♦ enzimuria (alt soprattutto);
- ♦ l'aumento delle vldl, si può osservare nelle fasi di cronicizzazione della malattia è espressione di grave danno renale (nefrite o nefrosi);
- ♦ amiloidosi.¹²⁷

Le lesioni renali caratteristiche sono determinate da una grave sindrome nefritica e/o nefrosica causata da glomerulonefrite mesangioendoteliale proliferativa e/o nefrite tubulo-interstiziale, dovute alla deposizione di immunocomplessi o autoanticorpi anti-membrana basale glomerulare. Quando l'insufficienza renale che si realizza arriva al 75% la terapia facilmente sortirà esito negativo.

Pertanto è fondamentale monitorare e stadiare, secondo le indicazioni iris (esami urine, emato-biochimici, rilevazione pressione sistemica) i pazienti leishmaniotici nefropatici.

Questa così varia sintomatologia, come già detto, è causata dall'evoluzione patogenetica della malattia stessa che trova la sua spiegazione nel lento e continuo contatto dell'antigene con le cellule immunocompetenti.

Accanto a queste forme cliniche tipiche, però, sempre più frequentemente vengono riscontrati dei quadri sintomatologici particolari e non convenzionali; ciò pare correlato sia alla differente virulenza dei vari ceppi di *Leishmania* sia alle condizioni immunitarie dell'animale sempre più spesso, infatti, vengono segnalate forme atipiche con localizzazione del parassita in sedi insolite¹²⁸.

Uno degli esempi più riportati è la presenza di forme neoplastiche veneree associate alla Leishmaniosi; in questi casi già segnalati da diversi Autori, la patogenesi, tuttavia, resta ancora oscura.

Nella tabella di seguito riportata (tabella 8) gli stadi della malattia vengono distinti in base alla gravità del quadro clinico.

Tabella 8: stadi della malattia secondo Solano – Gallego et al. 2009

Clinical stages	Serology ^a	Clinical signs	Laboratory findings	Therapy	Prognosis
Stage I: mild disease	Negative to low positive antibody levels	Dogs with mild clinical signs such as peripheral lymphadenopathy, or papular dermatitis (Ordeix et al., 2005; Bottero et al., 2006)	Usually no clinicopathological abnormalities observed; normal renal profile: creatinine < 1.4 mg/dl; non-proteinuric: UPC < 0.5	Scientific neglect/ allopurinol alone/ allopurinol + meglumine antimoniate or miltefosine	Good
Stage II: moderate disease	Low to high ^b positive antibody levels	Dogs, which apart from the signs listed in stage I, may present: diffuse or symmetrical cutaneous lesions such as exfoliative dermatitis/onychogryphosis, ulcerations (planum nasale, footpads, bony prominences, mucocutaneous junctions), anorexia, weight loss, fever, and epistaxis (Petanides et al., 2008)	Clinicopathological abnormalities such as mild non-regenerative anemia, hypergammaglobulinemia, hypoalbuminemia, serum hyperviscosity syndrome (Petanides et al., 2008). Substage—(a) normal renal profile: creatinine < 1.4 mg/dl; non-proteinuric: UPC < 0.5. (b) Creatinine < 1.4 mg/dl; UPC = 0.5–1	Allopurinol + meglumine antimoniate or miltefosine	Good to guarded
Stage III: severe disease	Medium to high positive antibody levels	Dogs, which apart from the signs listed in stages I and II, may present signs originating from immune-complex lesions: vasculitis, arthritis, uveitis and glomerulonephritis	Clinicopathological abnormalities listed in stage II Chronic kidney disease (CKD) IRIS stage I with UPC > 1 or stage II (creatinine 1.4–2 mg/dl) (IRIS, 2006a)	Allopurinol + meglumine antimoniate or miltefosine Follow IRIS guidelines for CKD (IRIS, 2006b)	Guarded to poor
Stage IV: very severe disease	Medium to high positive antibody levels	Dogs with clinical signs listed in stage III. Pulmonary thromboembolism, or nephrotic syndrome and end stage renal disease	Clinicopathological abnormalities listed in stage II CKD IRIS stage III (creatinine 2–5 mg/dl) and stage IV (creatinine > 5 mg/dl) (IRIS, 2006a) Nephrotic syndrome: marked proteinuria UPC > 5	Allopurinol (alone) Follow IRIS guidelines for CKD (IRIS, 2006b)	Poor

^a Dogs with negative to medium positive antibody levels should be confirmed as infected with other diagnostic techniques such as cytology, histology/immunohistochemistry and PCR.

^b High levels of antibodies are conclusive of a diagnosis of CanL and are defined as three- to four fold increase of a well established laboratory reference cut-off.

3.9 Diagnosi

La diagnosi clinica non è semplice ed è complicata dalla variabilità del quadro clinico non patognomonico, che deve essere opportunamente differenziato da altre malattie quali:

- × EPATOOZONOSI;
- × RICKETZIOSI;
- × EHRLICHIOSI;
- × BABESIOSI;
- × LINFOMA;
- × DERMATITE ALLERGICA ALIMENTARE;
- × D.A. DA MORSO DI PULCI;
- × D. ATOPICA;
- × DEMODICOSI;
- × ROGNA SARCOPTICA.

Da menzionare la predisposizione per i soggetti di sesso maschile^{129 130} e per alcune razze come il boxer ed il pastore tedesco,^{131 132} infine, in merito all'età d'insorgenza della malattia bisogna evidenziare che quest'ultima ha una distribuzione bimodale, con un picco nei soggetti di età inferiore ai tre anni e fra gli 8 e 10 anni.¹³³

Per la diagnosi sperimentale è necessario effettuare delle indagini specifiche¹³⁴ ed aspecifiche, mediante delle analisi emato-chimiche, che devono permettere di individuare con certezza i soggetti malati.

Tali esami permettono di valutare la funzionalità di alcuni organi, di valutare le condizioni generali del paziente, di controllare l'efficacia e gli effetti collaterali del trattamento farmacologico, e di emettere una prognosi.

La diagnosi di laboratorio si avvale, quindi, di **esami aspecifici** e di **esami specifici**.

I primi possono essere considerati esami di routine necessari per permettere un primo approccio diagnostico e per poter definire un quadro completo della eventuale compromissione clinica del soggetto. Non trascurando l'importanza di tali quadri, però, si deve tener presente che alterazioni simili a quelle indotte dalla leishmaniosi possono essere causate da altri processi morbosi. La diagnosi di certezza, pertanto deve essere basata sugli esami specifici.

Gli esami specifici per la diagnosi di Leishmaniosi canina possono essere indiretti (prove sierologiche) per evidenziare la presenza di anticorpi anti-leishmania nel siero dell'ospite, ed esami diretti (microscopici, colturali, prove biologiche, tecniche di PCR). Si tratta di esami definitivi solo quando il risultato è positivo, mentre se questo è negativo non si può escludere l'infezione, in quanto il parassita potrebbe non essere rilevabile se presente in numero esiguo nell'animale infetto.

Una certa percentuale di soggetti infetti può negativizzarsi ad alcuni dei test diagnostici, dopo un periodo generalmente breve dal primo riscontro positivo e senza aver ricevuto terapia. Non è noto, in realtà, se questi soggetti si siano liberati dall'infezione, abbiano contenuto l'infezione ad un livello tale che essa non risulti più rilevabile con il metodo utilizzato o se il parassita si sia localizzato in tessuti diversi da quelli esaminati in sede di prima diagnosi.¹³⁵

3.9.1 Esami diretti

Gli esami biotici effettuabili facilmente nel cane sono: a) l'aspirazione con ago sottile di linfonodi superficiali, b) il prelievo midollare, c) più raramente l'apposizione su vetrino di lesioni ulcerative, d) la biopsia del derma, e recentemente e) tamponi congiuntivali.^{136 137 138} La biopsia linfonodale è la più usata, in quanto semplice, non dolorosa ed economica, richiedendo una semplice siringa. E' però meno sensibile dell'aspirato midollare. E' effettuata per lo più a

livello dei linfonodi prescapolari o poplitei, facilmente esplorabili e solitamente aumentati di volume in corso di infezioni da *Leishmania*.

La biopsia midollare può essere effettuata a vari livelli: testa del femore, ala iliaca, sterno. Questa metodica è più sensibile della precedente, però è più invasiva.

In merito all'utilizzo dei tamponi congiuntivali, quest'ultima tecnica si è rivelata particolarmente efficace per diagnosticare precocemente la malattia una valutazione comparativa delle diverse metodiche impiegate per la diagnosi di leishmaniosi canina, ha, infatti, dimostrato una sensibilità superiore (100%) per i tamponi congiuntivali rispetto ai campioni ottenuti da altre matrici organiche (82%) e superiore al test IFAT (70%). L'elevatissima sensibilità del metodo è stata confermata anche dalla positività dei tamponi congiuntivali eseguiti in alcuni cuccioli asintomatici risultati negativi a tutti gli altri test. Una possibile spiegazione può essere attribuita in parte al fatto che la zona palpebrale è una delle sedi preferenziali di puntura dei flebotomi, il che potrebbe giustificare la deposizione di numerosi parassiti a livello oculare. Il test congiuntivale risulta positivo anche in cani adulti asintomatici e in quelli sottoposti a terapia.¹³⁹

3.9.1.1 Esami cito-istologici

Rappresentano il metodo più semplice per la dimostrazione diretta della presenza del protozoo, nei linfonodi, nella cute, nel midollo osseo, nella milza e a livello oculare; oppure nel flebotomo (xenodiagnosi).

Si effettuano mediante:

Esami microscopici che permettono di identificare con certezza l'amastigote. La diagnosi certa di leishmaniosi si ottiene da materiale biotico con l'osservazione diretta degli amastigoti di *Leishmania* attraverso l'esame cito-istologico, o con l'isolamento del protozoo in forma flagellata (promastigote) su terreni di coltura, o l'isolamento *in vivo* su animale di laboratorio recettivo (criceto), o ancora con

il rilevamento del DNA del parassita attraverso la tecnica della reazione polimerasica a catena (PCR).

Si tratta di esami definitivi solo quando il risultato è positivo, mentre se questo è negativo non si può escludere l'infezione, in quanto il parassita potrebbe non essere rilevabile se presente in numero esiguo nell'animale infetto.

Gli esami biotici effettuabili facilmente nel cane sono: a) l'aspirazione con ago sottile di linfonodi superficiali, b) il prelievo midollare, c) più raramente l'apposizione su vetrino di lesioni ulcerative, d) la biopsia del derma, e recentemente e) tamponi congiuntivali.

La biopsia linfonodale è la più usata, in quanto semplice, non dolorosa ed economica, richiedendo una semplice siringa. E' però meno sensibile dell'aspirato midollare. E' effettuata per lo più a livello dei linfonodi prescapolari o poplitei, facilmente esplorabili e solitamente aumentati di volume in corso di infezioni da *Leishmania*.

La biopsia midollare può essere effettuata a vari livelli: testa del femore, ala iliaca, sterno. Questa metodica è più sensibile della precedente, però è più invasiva.

3.9.1.1 Esame citologico

Il materiale ottenuto da aspirato o biopsia viene strisciato su vetrino (Figura 9), fissato in metanolo e colorato con Giemsa. L'osservazione al microscopio (400-

1.000 x) evidenzia i macrofagi parassitati e gli amastigoti liberi negli spazi extracellulari in caso di rottura degli istiociti durante lo striscio su vetrino.

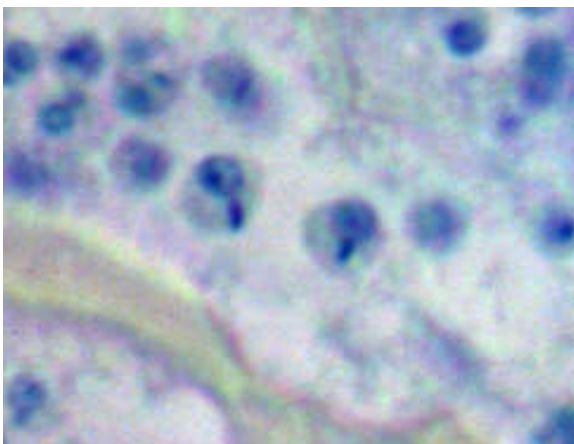


Figura 10. Amastigoti in una sezione di tessuto infetto.

La ricerca degli amastigoti su vetrino permette inoltre di quantificare la carica parassitaria del soggetto utilizzando una scala di valori proposta da Chulay e Bryceson per l'uomo (1983)¹⁴⁰, con un intervallo compreso tra 0 e 6+, a seconda del numero di parassiti presenti nei campi microscopici (1.000 x) considerati. Il grado 6+ corrisponde ad una densità parassitaria maggiore di 100 leishmanie per campo, mentre il grado 0 a nessun parassita in 1.000 campi microscopici¹⁴¹. Questa indagine, oltre a consentire una migliore classificazione clinico-parassitologica dell'animale può essere utile per monitorare l'efficacia dei farmaci utilizzati che possono determinare l'abbattimento pressoché totale della carica parassitaria, per un periodo di alcuni mesi.¹⁴²

3.9.1.1.2 Esame istologico

L'amastigote può essere evidenziato in sezioni allestite da lesioni colorate con ematossilina-eosina. In associazione al parassita, possono anche essere evidenziate altre alterazioni compatibili con la leishmaniosi canina.

Il ricorso a questo esame è sempre consigliabile soprattutto in presenza di dermatiti e nelle forme cutanee caratterizzate da lesioni focali.

E' importante, comunque, dire che con questa tecnica è difficile riconoscere le forme parassitarie.¹⁴³

3.9.1.1.3 Esame istochimico

Questo test diagnostico può essere usato per confermare la diagnosi istopatologica. La ricerca degli amastigoti in tessuti inclusi in paraffina e successivamente fissati in formalina può essere applicata usando il sistema streptavidina-perossidasi/biotina con siero iperimmune canino come anticorpo primario e l'uso di anticorpi anti-*Leishmania* policlonali o monoclonali.¹⁴⁴

3.9.1.2 Esame colturale

Lo stesso campione biotico può essere usato anche per l'isolamento colturale, capace di ampliare il numero dei parassiti presenti originariamente nel prelievo effettuato, è quindi di particolare importanza quando l'esame microscopico risulta negativo. Si utilizzano opportuni terreni di coltura costituiti da una fase solida addizionata di sangue intero di coniglio e una fase liquida dove il parassita si moltiplica lentamente a cadenza settimanale i terreni vengono osservati per evidenziare l'eventuale presenza del parassita sotto forma di promastigote.

3.9.1.3 Xenodiagnosi

Il metodo consiste nel far nutrire sul cane sospetto un certo numero di flebotomi allevati in laboratorio che sono poi esaminati alcuni giorni dopo per la presenza di promastigoti nel tratto intestinale. La tecnica è molto sensibile ma di scarsa applicabilità pratica.

Queste tecniche sono economiche, ed hanno, inoltre, un'elevata specificità data dal riconoscimento all'interno dei macrofagi degli amastigoti. Per contro il loro limite è la bassa sensibilità.

La diagnosi parassitologia deve essere sempre presa in considerazione dal veterinario pratico particolarmente per quei soggetti clinicamente sospetti con IFI dubbia o negativa, o, nei soggetti malati, in seguito alla terapia ed alla negativizzazione dell'esame sierologico.

3.9.1.4 Esami molecolari

3.9.1.4.1 Polymerase chain reaction (PCR) e Nested-PCR

La PCR è un metodo rapido e versatile che consente di amplificare esponenzialmente una specifica sequenza nucleotidica presente in un campione eterogeneo di acido nucleico (Figura 11).

Condizione indispensabile per amplificare selettivamente un frammento di DNA è la conoscenza della sequenza nucleotidica del segmento in esame, al fine di poter sintetizzare i due primers specifici, i quali, con le loro estremità 3' fungono da innesco a partire dal quale l'enzima Taq-polimerasi sintetizza un filamento di DNA complementare a quello di stampo.

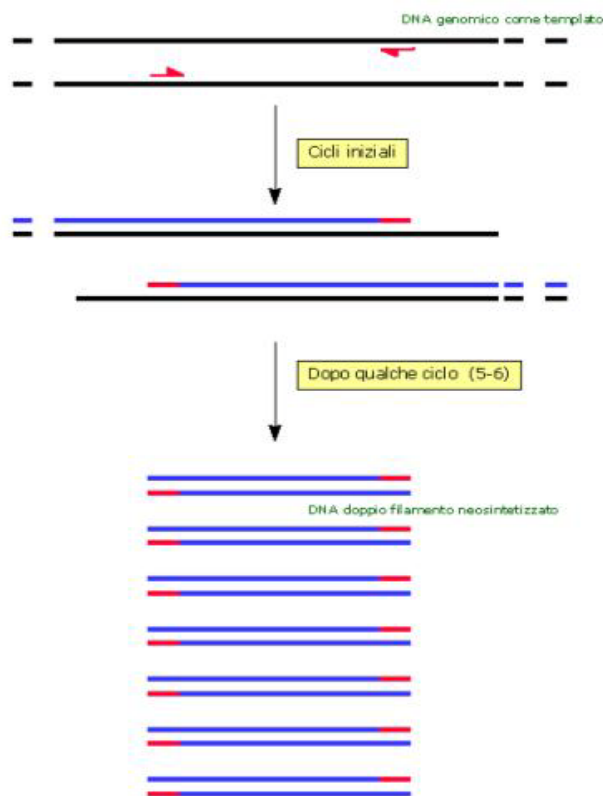


Figura 11. Amplificazione di un frammento di DNA genomico.

Per migliorare la sensibilità e specificità della PCR, a scopo diagnostico, è stata messa a punto la tecnica di Nested (n)-PCR. Essa si basa sull'esecuzione di due PCR sequenziali:

- a) nella prima PCR viene usato come “templato” il DNA estratto dal materiale in esame e i primers specifici;
- b) nella seconda PCR, il DNA utilizzato è costituito da minime aliquote della reazione precedente (contenete il target eventualmente amplificato, ma non rilevabile perché presente in un basso numero di copie) e i primers più interni alla sequenza genica amplificata dai primers precedenti.

La PCR e la n-PCR sono state applicate alla diagnosi della leishmaniosi umana e canina su sangue intero, aspirato linfonodale o midollare^{145 146 147 148}, su campione bioptico di cute¹⁴⁹, su tamponi congiuntivali^{150 151 152}; la sostanziale concordanza tra esame colturale e amplificazione genica ha suggerito la possibilità di sostituire la coltivazione in vitro con tecniche di PCR, con conseguente accelerazione dei risultati ottenibili in 24-48 ore contro i 3-30 giorni richiesti dall'esame colturale.

3.9.1.4.2 PCR quantitativa (Real time PCR)

Grazie all'utilizzo di sonde fluorescenti, è possibile quantificare il numero di copie di DNA presenti nel campione biologico (figura 12). Questa tecnica ha una sensibilità simile alla n-PCR, ma se eseguita con sistemi “chiusi” è più specifica perché il campione subisce un numero minore di manipolazioni ed è quindi meno soggetto a contaminazioni^{153 154}

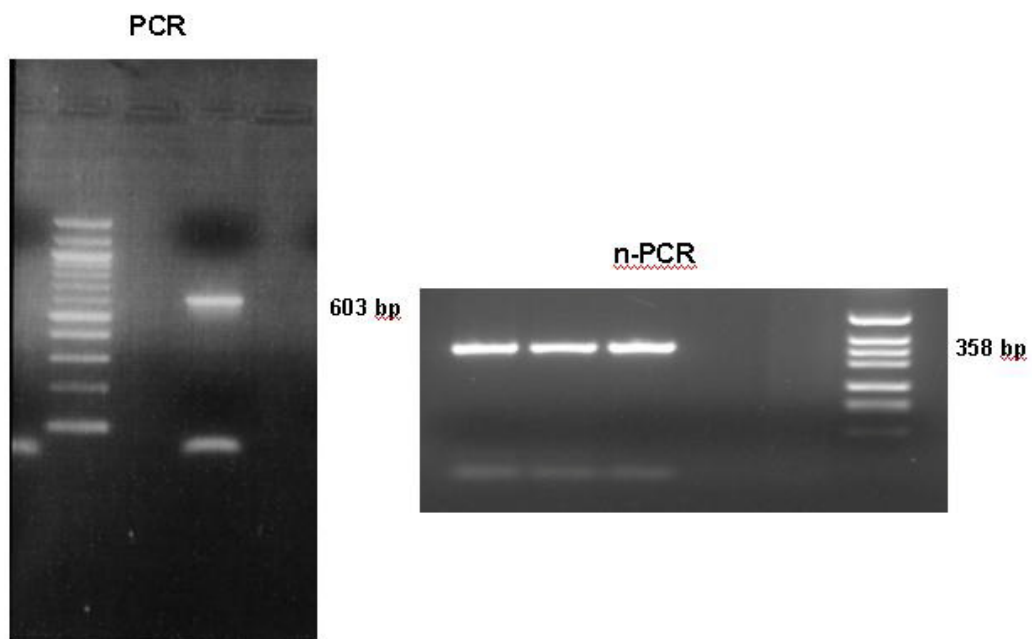


Figura 12. Prodotti di PCR e n-PCR della sequenza ripetuta del SSU rRNA di *Leishmania* (Van Eys et al., 1992) ottenuti a partire da campione di midollo osseo di cane infetto.

3.9.2 Esami indiretti

Le metodiche sierologiche rappresentano un importante strumento diagnostico ed epidemiologico. Gli anticorpi (Ab) sono rilevati tramite l'utilizzo di antigeni (Ag) figurati (promastigoti interi), o solubili (ottenuti dai promastigoti in seguito ad estrazione). Le principali tecniche sierologiche utilizzate a questo scopo sono l'immunofluorescenza indiretta e l'ELISA.

3.9.2.1 Esami sierologici

Si basano sulla dimostrazione della presenza di anticorpi anti-*Leishmania* (IgG1) circolanti nel sangue. I soggetti affetti da tale patologia, infatti, sviluppano un'intensa risposta umorale, tanto che è possibile rilevare un'elevata quantità di anticorpi (IgG anti-leishmania) nel loro siero.

Ciò nonostante, queste indagini non possono essere usate come unico test poiché possono dare dei risultati falsamente positivi, in soggetti resistenti o venuti solo a contatto col parassita, o falsamente negativi, in soggetti che non hanno ancora elaborato una risposta anticorpale rilevabile o che, pur essendo malati, non producono anticorpi.

Gli esami utilizzati a tale scopo sono:

- ☞ IFAT (immunofluorescenza indiretta);
- ☞ ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay);
- ☞ Dot ELISA;
- ☞ IHAT (emoagglutinazione indiretta);
- ☞ Agglutinazione con lattex;
- ☞ DAT (Agglutinazione diretta);
- ☞ CIEP (controimmunolettroforesi);
- ☞ Fissazione del Complemento (FdC);
- ☞ Test all'inchiostro di china;
- ☞ Western blot.

Negli ultimi vent'anni sono state valutate ed utilizzate ampiamente due tecniche: l'IFAT e l'ELISA¹⁵⁵.

Per queste due prove si utilizzano come antigeni dei protozoi interi; questo permette di ottenere dei risultati più attendibili.

3.9.2.1.1 IFAT

L'IFAT è il test più utilizzato, ed è il metodo di riferimento secondo l'Organizzazione Internazionale delle Epizootie (OIE)¹⁵⁶.

È basato su una tecnica abbastanza sicura in quanto dotata di specificità e sensibilità elevate purché, e questo rappresenta il suo svantaggio, sia effettuata sempre presso lo stesso laboratorio.

Viene riportata una specificità di circa il 100% per titoli anticorpali superiori a 1/160, valore che attualmente viene accettato da esperti italiani e francesi come titolo soglia per diagnosticare un'infezione da *Leishmania*.

Titoli compresi fra 1/40 e 1/80, in assenza di sintomi, devono essere considerati dubbi.

Quelli fino a 1/40 sono negativi, e quelli superiori ad 1/80 sono da considerarsi positivi.

Anche se la malattia può essere presente nonostante la sierologia negativa (Mancianti, 2001).

Nei casi dubbi è consigliabile la ripetizione dell'esame a distanza di 20-30 giorni.

Sempre in merito a questi titoli è necessario un ulteriore supporto diagnostico attraverso la ricerca dei parassiti nei linfonodi o nel midollo osseo.

Nonostante la metodica IFAT¹⁵⁷ sia una tecnica fondamentale e routinaria per la diagnosi di *Leishmaniosi* canina, alcuni Autori¹⁵⁸ ne rilevano numerose problematiche, legate sia alla metodica sia all'interpretazione dei risultati ottenuti, pertanto ne stabiliscono dei limiti. Bisogna tener presente, infatti, che la ricerca di anticorpi attraverso l'immunofluorescenza è una prova

semiquantitativa, legata alla qualità dei reagenti impiegati, all'esperienza e capacità degli operatori.

La tecnica Evidenzia la presenza e titola gli Ab specifici, utilizzando come Ag promastigoti fissati su vetrino. La presenza di Ab anti-leishmania nel siero in esame viene rilevata dall'aggiunta di Ab anti-immunoglobuline di specie coniugati con isotiocianato di fluorescina. Il siero positivo conferisce una netta fluorescenza ai promastigoti e al flagello, rilevabile al microscopio a luce ultravioletta (Figura 13).

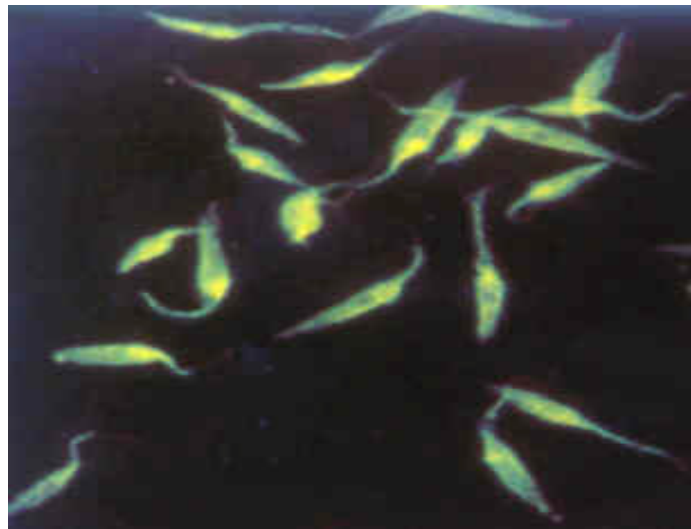


Figura 13. Reazione di immunofluorescenza indiretta positiva eseguita con siero di cane affetto da leishmaniosi (substrato antigenico: promastigoti di *L. infantum* da coltura in vitro) (630 x).

L' IFAT per la sua elevata specificità e sensibilità ¹⁵⁹ è considerato da tempo il test sierologico di riferimento sia per la leishmaniosi umana che canina. E' infatti usato per la diagnosi del singolo caso clinico, per lo screening di massa nelle zone endemiche, e per la comparazione con nuove metodiche sierologiche. Piergili *et al* ¹⁶⁰ hanno ottenuto buona sensibilità e specificità con titoli anticorpali significativi (maggiore di 1:80) mentre titoli bassi possono

rappresentare una risposta aspecifica. In definitiva questa tecnica diagnostica è sensibile e specifica, il suo limite maggiore sta nell'utilizzo di strutture adeguatamente attrezzate per la lettura, e soprattutto nella soggettività dell'interpretazione del risultato.

3.9.2.1.2 ELISA

E' una tecnica immunoenzimatica molto sensibile, in quanto usa come marker un enzima che reagendo con un numero elevato di molecole substrato, è capace di determinare una reazione colorimetrica anche in presenza di titoli anticorpali modesti.

L'Ag solubile è adsorbito passivamente alle pareti di pozzetti di apposite piastre microtitre e messo a contatto con il siero in esame. Dopo l'aggiunta di Ab anti- γ -globuline, marcate con l'enzima, cui segue la formazione di complessi Ag-Ab-Ab, e del substrato, si valuta la reazione colorimetrica al lettore ELISA.

Nel 1993, Burns *et al* hanno descritto l'isolamento e la caratterizzazione di un Ag ricombinante ottenuto da *L. chagasi* (specie diffusa nel Nuovo Mondo ma geneticamente identica a *L. infantum*). L'obiettivo originario era quello di individuare un prodotto che fosse immunodiscriminante nelle infezioni umane da *Leishmania* e da *Trypanosoma cruzi*, agente della tripanosomiasi americana. Infatti queste specie sono altamente cross-reattive quando vengono utilizzati sistemi sierologici basati su antigeni crudi. Le colonie batteriche ricombinanti esaminate sono state circa 32.000, delle quali 7 esprimevano prodotti reattivi con un siero di un paziente affetto da leishmaniosi viscerale. Un clone in particolare presentava una proteina ricombinante estremamente reattiva, dalla dimensione stimata sull'estratto batterico di circa 39 kDa, che includeva la sequenza di fusione plasmidica. Esperimenti di immunoblot, utilizzando la proteina purificata, mostravano che essa veniva riconosciuta da vari sieri di pazienti con leishmaniosi viscerale dovuta a *L. chagasi* e *L. donovani*, ma non di pazienti con leishmaniosi cutanea, mucocutanea o con tripanosomiasi

americana. La caratterizzazione successiva ha mostrato similarità di sequenza della proteina con la famiglia delle kinesine; inoltre è stata individuata una sequenza di 39 amminoacidi ripetuta a tandem in 6,5 copie facenti parte di una proteina predominante (230 kDa). Sia dalla natura della proteina che da quest'ultima caratteristica, l'antigene è stato chiamato K39.

Il test ELISA-rK39 si è rivelato estremamente efficace nella diagnosi della leishmaniosi canina. In uno studio multicentrico coordinato dal Laboratorio di Parassitologia dell'Istituto Superiore di Sanità, il siero di 6.368 cani è stato esaminato in parallelo con l'IFAT. La concordanza dei due test è risultata molto elevata (0.95–0.98)¹⁶¹

3.9.2.1.3 Counterimmunoelectrophoresis (CIE)

Questa è una tecnica che valuta il legame tra antigene e anticorpo, è simile ad una immunodiffusione con l'aggiunta di un campo elettrico. Può essere usata analizzando i sieri di diversi ospiti simultaneamente e non richiede immunoglobuline specifiche. E' molto usata negli studi epidemiologici in quanto rapida e a basso costo.¹⁶²

3.9.2.1.4 Saggio di immunodiffusione (IDA)

Questa tecnica consiste in una doppia immunodiffusione in un gel d'agarosio all'1% contenente il 3% di glicole polietilene. La formazione di bande si osserva dopo 24 ore tramite Blu di Coomassie. Questo saggio è di facile esecuzione ed ha una specificità medio-alta.¹⁶³

3.9.2.1.5 Test di agglutinazione diretta (DIA)

E' una metodica semplice, economica, ed adattabile alle esigenze "di campo" in quanto non richiede particolari apparecchiature per la lettura.

L'antigene sotto forma di promastigote, viene messo a contatto, in pozzetti di piastre microtitre, con diluizioni per raddoppio del siero in esame. Lo stato

fisico-chimico corpuscolato dell'antigene determina, in presenza di anticorpi, una reazione di agglutinazione visibile ad occhio nudo.

3.9.2.1.6 Immunomigrazione rapida

E' di facile esecuzione e si può eseguire anche in strutture ambulatoriali, ma ha un'efficienza diagnostica inferiore rispetto alle tecniche ELISA ed IFAT: la specificità è medio-alta ma la sensibilità bassa.¹⁶⁴

Questa tecnica è un test di immunocromatografia che usa l'antigene commerciale rK39 fissato su cartine di nitrocellulosa. Il risultato è considerato positivo quando compaiono due linee: il controllo e il campione in esame.

3.9.2.1.7 Western blotting (WB)

Mostra ottime prestazioni diagnostiche ma non viene utilizzato su larga scala per ragioni di tempi di esecuzione e di costi.¹⁶⁵

E' una tecnica immunologica basata sulla caratterizzazione degli antigeni proteici costituenti il microrganismo. Le frazioni polipeptidiche, ottenute mediante trattamento con detergenti, sono separate per migrazione elettroforetica in gel di poliacrilamide, e le diverse bande ottenute sono poi trasferite su membrane di nitrocellulosa ove vengono fissate. Le strisce così ottenute sono esposte ai campioni di siero in esame e l'eventuale presenza di anticorpi anti-immunoglobuline di specie, marcati con l'enzima perossidasi, e il relativo substrato cromogeno¹⁶⁶

3.9.2.1.8 Fluorocitometria (FC)

E' una tecnica di misurazione multiparametrica di caratteristiche fisiche e/o chimiche condotta su cellule in sospensione all'interno di un fluido di trasporto. Le cellule passano allineate attraverso un sistema di rilevazione ottico o elettronico. Questa analisi è rapida, accurata e riproducibile.¹⁶⁷

Le prove più utilizzate comunque, per evidenziare la presenza di anticorpi sono l'IFAT, l'ELISA^{168 169}, il DAT, ed il Western blot, la cui sensibilità/specificità varia dall'80 al 100%.

I risultati positivi dei test sierologici non indicano necessariamente la presenza della malattia (nelle zone endemiche molti soggetti precedentemente infettati riescono ad eliminare il protozoo, risultano quindi sieropositivi a basso titolo, anche se sani), perché non è certo che alla puntura di un vettore infetto sia conseguente uno stato di infezione persistente; è ipotizzabile che questa si realizzi solo dopo diversi contatti tra il parassita e l'ospite.

3.9.3 Prove di laboratorio aspecifiche

Le prove di laboratorio aspecifiche permettono, invece, di individuare le alterazioni clinico-patologiche più significative correlate alle sofferenze d'organo o di apparati imputabili alla Leishmaniosi, mediante:

- œ l'esame emocromocitometrico;
- œ la protidemia;
- œ l'elettroforesi delle proteine;
- œ la formol-gelificazione;
- œ l'uremia;
- œ la creatininemia;
- œ gli enzimi epatospecifici;
- œ la VES;
- œ l'esame delle urine (proteinuria, PU/CU¹⁷⁰).

L'anemia è uno dei reperti clinici nei soggetti affetti dalla leishmaniosi, insieme alla trombocitopenia,¹⁷¹ anomalie dell'emostasi, ed alla leucocitosi.^{172 173}

L'anemia, normocitica e normocromica, è la conseguenza della riduzione dell'eritropiesi dovuta alla cronicizzazione dell'infezione e/o all'insufficienza renale cronica¹⁷⁴ ed alla carenza di ferro secondaria alle perdite ematiche

croniche (epistassi intermittente cronica, ulcerazioni cutanee) o acute (epistassi profusa).

Le anomalie dell'emostasi (epistassi, ematuria, diarrea emorragica) sono conseguenti alla trombocitopenia, alla trombocitopatia, al prolungamento del tempo di protrombina e di tromboplastina parziale attivata, ed, infine, all'aumento dei prodotti di degradazione fibrinogeno/fibrina.^{175 176}

La valutazione della protidemia e dell'elettroforesi delle proteine^{177 178} permette di stimare l'entità delle alterazioni che si manifestano nel corso dell'infezione che sono rappresentate da:

- Incremento delle proteine totali (PT).
- Inversione del rapporto albumine/globuline (A/G):

la disprotidemia che contraddistingue la malattia è sostenuta da una diminuzione dell'albumina e da un aumento delle globulina (2-globulina, e -globulina); l'ipoalbuminemia è dovuta alla nefropatia e all'enteropatia proteino-disperdente, alla diminuzione della sintesi epatica, ed ai processi flogistici che caratterizzano la forma viscerocutanea della patologia;

l'iper 2-globulinemia indica la presenza della fase acuta della malattia; è, quindi, possibile riscontrare tale alterazione anche in corso di riacutizzazioni. L'aumento di queste proteine può anche essere espressione di un interessamento renale.

L'iper -globulinemia è l'espressione dei processi flogistici in atto;

l'iper -globulinemia può essere tipica delle forme di vecchia data, e potrebbe essere dovuta alla presenza di un clone maligno che potrebbe evolvere in una neoplasia.

Alcuni Autori hanno, infatti, ipotizzato che le variazioni quantitative e qualitative delle immunoglobuline in corso di Leishmaniosi possono avere un ruolo nel determinare l'insorgenza di un'affezione neoplastica, sia perché il protozoo potrebbe rendersi responsabile della trasformazione maligna di un

clone cellulare sia perché in corso di neoplasie il parassita deprime l'immunità cellulo-mediata ed i fenomeni di citotossicità (cellule K ed NK).

Il quadro elettroforetico delle proteine permette di valutare diversi parametri come:

- × l'anzianità dell'infezione (infezione recente, di vecchia data, ricaduta, ecc.);
- × la gravità della patologia;
- × lo stadio evolutivo della malattia;
- × il monitoraggio dei trattamenti terapeutici.

Quando il tracciato elettroforetico delle proteine è piuttosto normale ed il titolo anticorpale non è molto alto, è ipotizzabile che il soggetto sia stato contagiato dal protozoo, e che si sia ben difeso dall'infezione (attivazione Th1-neutralizzazione da parte dei macrofagi). Al contrario, quando il tracciato è molto alterato ed il titolo anticorpale risulta molto alto, è ammissibile l'attivazione dei Th2 con iperproduzione di IgM.

Nella tabella (tabella 9) di seguito riportata sono descritte le alterazioni

Rilevi compatibili con LCan negli esami di laboratorio di base e di approfondimento		
Esami di base	Riscontri compatibili con leishmaniosi	Esami di approfondimento
Emocromocitometrico	Anemia scarsamente o non rigenerativa Possibile anemia rigenerativa (per processi immunomediati) Leucocitosi neutrofila e monocitaria con linfopenia ed eosinopenia (leucogramma da stress/infiammazione) Leucopenia Eventuale trombocitopenia	Citofluorimetria per la ricerca di anticorpi antieritrociti Esame citologico del midollo osseo Profilo coagulativo completo (ad es., aumento FDP* e decremento AT*) Ricerca coinfezioni (ad es. da <i>Ehrlichia canis</i>) Citofluorimetria per la ricerca di anticorpi antiplastrine
Profilo coagulativo di base	Iperfibrinogenemia, possibile allungamento PT e aPTT	Profilo coagulativo completo (come sopra)
Profilo biochimico	Iperproteinemia, ipoalbuminemia, iperglobulinemia, alterato rapporto Albumine/Globuline Azotemia (valori elevati di urea [BUN] e creatinina sierici) Aumento degli enzimi epatici	Proteine di fase acuta: CRP*, Hp*, SAA* (utili per il monitoraggio) Parametri lipidici (ipercolesterolemia) Elettroliti (ipokaliemia) Minerali Ca/P, Mg (iperfosforemia/permagnesiemia) Emogasanalisi (acidosi metabolica) Test di funzionalità epatica
Elettroforesi delle sieroproteine	Ipoalbuminemia, Aumento di globuline α_2 e gammopatia poli/oligoclonale	Proteine di fase acuta: CRP*, Hp*, SAA* (utili per il monitoraggio)
Analisi delle urine	Urine isostenuriche (PS*:1008-1012) o scarsamente concentrate (<1030) Proteinuria (determinata con strisce reattive e PU/CU*)	SDS-AGE* urine (compatibile con leishmaniosi: proteinuria glomerulare o mista)

* FDP=prodotti di degradazione di fibrina/fibrinogeno; AT=antitrombina III; CRP=Proteina C reattiva; Hp=aptoglobina; SAA= siero-amiloide A; PS=peso specifico; PU/CU=rapporto proteine/creatinina urinarie; SDS-AGE= elettroforesi in gel d'agarosio-sodiododecil solfato.

ematologiche e biochimiche riscontrabili in corso di Leishmaniosi.

Tabella 9: da Paltrinieri et al. 2010

3.10 Terapia

I farmaci attualmente impiegati nel trattamento della LC consentono nella maggioranza dei casi un buon recupero clinico, ma non evitano le ricadute che possono presentarsi a distanza variabile di tempo.¹⁷⁹

I discreti successi sono imputabili a diverse cause:

- un profondo squilibrio immunitario che si manifesta in corso d'infezione;
- la difficoltà di interazione farmaco-bersaglio (la presenza di cellule parassitate in distretti poco vascolarizzati come cute, tessuti cheratinizzati, ecc. , rende problematico il raggiungimento di concentrazioni intracellulari terapeutamente efficaci);
- l'esistenza di ceppi resistenti ai chemioterapici antimoniali.

Prima di intraprendere la terapia è importante valutare¹⁸⁰:

- il grado di compromissione clinica del soggetto (asintomatico-oligosintomatico-sintomatico-marcatamente sintomatico);
- la funzionalità epato-renale (è necessaria per la corretta scelta del farmaco, per l'emissione di un giudizio prognostico e per l'istituzione di una terapia di supporto);
- la carica parassitaria (aspirato linfonodale e midollare per quantificare la carica parassitaria prima e dopo i trattamenti);
- lo stato immunitario dell'animale (tipo di risposta innescata Th1- Th2).

3.10.1 TERAPIA SPECIFICA

Lo scopo della terapia anti-*Leishmania* mira a ridurre la carica parassitaria del paziente, a controllare i danni prodotti dal parassita, a ripristinare la risposta immunitaria del soggetto ed, infine, a stabilizzare nel tempo le condizioni del paziente in modo da ritardare il più possibile le recidive.

È possibile ottenere il controllo e, a volte, la guarigione clinica della malattia con l'uso di¹⁸¹:

× **ANTIMONIALI PENTAVALENTI** - Antimoniato di N-metilglucamina (GLUCANTIME)

È l'unico farmaco a base di antimonio pentavalente utilizzato in Europa sia nel cane sia nell'uomo¹⁸²

Il Glucantime è il farmaco usato maggiormente per il trattamento della Leishmaniosi canina.

Il meccanismo d'azione pare essere legato all'inibizione di alcuni enzimi della glicolisi. L'emivita è breve, il farmaco non dà fenomeni d'accumulo e per tale motivo è poco tossico. Va somministrato fino alla scomparsa della sintomatologia, se tale periodo, però, supera le sei settimane, è opportuno ricorrere a farmaci alternativi, perché è possibile che il parassita sia resistente agli antimoniali.

Le iniezioni intramuscolari o sottocutanee prevedono un dosaggio di 100mg/kg da ripartire in due somministrazioni (una ogni 12h) per 30-60 giorni^{183 184}

L'utilizzo di tale protocollo però non permette la guarigione parassitologica del soggetto^{185 186 187 188} ma solo una riduzione della carica parassitaria¹⁸⁹

× **AMMINOSIDINA (AMINOFARMA)**

È un antibiotico ad ampio spettro, prodotto dallo *Streptomyces chrestomiceticus* appartenente alla famiglia delle amminoglucosidi.

L'attività antiprotozoaria è garantita dal contatto fra il farmaco ed il microrganismo, all'interno di quest'ultimo si accumula andando ad interferire con le unità ribosomiali in modo da alterare la trascrizione degli aminoacidi.

Per contro i fenomeni d'accumulo (quasi sempre reversibili) di questo antibiotico si realizzano a carico del tubulo prossimale renale e della perilinfa ed endolinfa dell'orecchio. Va utilizzato per via sottocutanea o intramuscolare

al dosaggio di 5,25 mg/kg ogni 12 ore per 14-28 giorni preferibilmente in associazione all'antimoniato di N-metilglucamina (60mg/kg/ sid sc)¹⁹⁰.

× **ALLOPURINOLO (ZILORIC)**

È un composto analogo all'ipoxantina.

Ha azione parassitostatica, grazie agli effetti tossici che determina all'interno del protozoo, che interferiscono con la sintesi proteica. È quasi privo di effetti indesiderati per le cellule dei mammiferi. Può essere impiegato nel trattamento delle recidive della malattia con 20mg/kg ogni 12h per OS da 1 a 24 mesi¹⁹¹
¹⁹².

Alcuni Autori sostengono che in presenza di lieve sintomatologia o in cani asintomatici l'uso di tale farmaco sia giustificato per tutta la vita del paziente.

Somministrato in monoterapia per non meno di 3-4 mesi può determinare un miglioramento clinico ed ematologico parziale^{193 194 195 196}

Il trattamento a base di allopurinolo può essere associato a quello a base di antimoniali.^{197 198}

× **AMFOTERICINA B**

Appartiene al gruppo degli antibiotici polienici, è prodotto dallo *Streptomyces nodus*, anche se è un antimicotico, è risultato efficace nel trattamento della Leishmaniosi.

L'uso del farmaco però, a causa della sua tossicità e della scarsa maneggevolezza, è stato limitato fino ad oggi.

Il suo meccanismo d'azione, infatti, si rende responsabile della morte del parassita per un'alterazione dell'ergosterolo (principale sterolo della membrana delle *Leishmanie*), che provoca la formazione di pori di membrana con la conseguente perdita di ioni fondamentali. Tale azione però, si manifesta anche a carico del colesterolo della membrana dei mammiferi, per tale motivo

la sostanza presenta degli effetti tossici di una certa entità, che si ripercuotono soprattutto a livello dei tubuli renali.¹⁹⁹

Questa tossicità è, però, stata limitata grazie alla messa a punto di nuove preparazioni farmaceutiche, che permettono l'incorporazione dell'antibiotico in strutture lipidiche (liposomi) naturali o sintetiche, nell'amfotericina B liposomizzata (AmBisome)²⁰⁰.

Il preparato si utilizza per via endovenosa 2-3 volte la settimana.

× PENTAMIDINA

Si tratta di un composto diamminico dotato di attività antifungina ed antiprotozoaria molto utilizzato in Francia e nei paesi del Mediterraneo per la terapia delle tripanosomiasi e delle LVU ed LC.

Pare che la sua azione provochi dei danni al DNA ed ai mitocondri del parassita.

Tale farmaco però dà luogo a fenomeni di accumulo a livello renale ed epatico a causa del suo lento smaltimento; pertanto, si rende responsabile di diversi effetti collaterali sia acuti sia cronici, inoltre, somministrata in muscolo ha una potente azione istolesiva. Viene utilizzata alla dose di 4mg/kg a giorni alterni, nonostante i gravi effetti che può provocare, per un periodo di 3 - 4 settimane²⁰¹, oppure alla dose di 4mg/kg SID im per 3 cicli di 8 gg con intervallo di una settimana²⁰², infine può essere somministrato in associazione o in alternativa agli antimoniali.

× MILTEFOSINA

L'obiettivo primario della ricerca terapeutica per la Leishmaniosi è quello di sostituire gli attuali farmaci ad uso parenterale, dotati di discreta tossicità, con una terapia orale, meno tossica e che preveda brevi cicli di trattamento.²⁰³

Un passo avanti, in questo senso, è stato possibile grazie agli esiti positivi ottenuti dalla sperimentazione della miltefosina (Miltex) in medicina umana. L'efficacia della cura è stata comprovata in numerosi studi.^{204 205}

Secondo Herwaldt²⁰⁶ la somministrazione orale del prodotto ha portato alla completa guarigione oltre il 90% dei pazienti affetti da una leishmania antroponotica.

Il farmaco, sviluppato inizialmente come antitumorale, è una esadecilfosfocolina in grado di interferire sui segnali metabolici cellulari e sulla sintesi di membrane, ed è registrato in India e Germania per il trattamento della Leishmaniosi Viscerale Umana.

Sulla base di tali risultati, oggi, sono attualmente in sperimentazione protocolli terapeutici a base di tale molecola anche in medicina veterinaria.²⁰⁷

Mirò G. et al, hanno valutato l'efficacia del trattamento a base di miltefosine su cani infetti naturalmente da *L.infantum*. Il lavoro riporta i dati di due trial effettuati in Francia e Spagna su 119 cani con malattia manifesta. I soggetti sono stati divisi in 2 gruppi. Il primo è stato trattato con il miltefosine somministrato per via orale al dosaggio di 2 mg/kg/die per 28 giorni, il secondo è stato trattato con metilmeglumine antimoniato somministrato per via SC al dosaggio di 100 mg/kg/ die per 28 giorni. I soggetti sono stati controllati ogni 14 giorni dall'inizio della terapia fino al 42° giorno. I risultati ottenuti incoraggiano ulteriori studi ed approfondimenti.²⁰⁸

Recenti studi sulla somministrazione al dosaggio di 2mg/kg BID po per 28 giorni hanno dimostrato un rapido assorbimento, una lunga emivita del farmaco, e l'assenza di eliminazione per via renale.

Il farmaco usato in associazione con allopurinolo ha mostrato una buona efficacia²⁰⁹

Altri farmaci utilizzabili nella terapia specifica

× KETOCONAZOLO (NIZORAL)

Interferisce nella biosintesi di parti della cellula parassitaria.

× TERBINAFINA (DASKIL – LAMISIL)

× ENROFLOXACINA (BAYTRIL)

È un chemioterapico di sintesi appartenente al gruppo dell'acido chilton carbossilico. Il meccanismo d'azione inibisce la DNA girasi (enzima responsabile della conformazione spaziale del DNA durante le fasi di moltiplicazione), in modo da bloccare tutte le funzioni vitali dei batteri.²¹⁰

× METRONIDAZOLO (FLAGYL - DEFLAMON - STOMORGYL)

Chemioterapico segnalato come farmaco anti-*Leishmania* in vitro.

Ha azione nei confronti di numerosi protozoi, arrestando la sintesi degli acidi nucleici.

Alcuni autori sostengono che l'associazione fra spiramicina (150.000 UI/kg SID po) e metronidazolo (25mg/kg SID po) per 90 giorni permetta un buon miglioramento clinico e degli esami di laboratorio²¹¹

× DOMPERIDONE

è un antagonista dei recettori D2 della Dopamina.

In un recente studio è stato utilizzato al dosaggio di 1mg/kg BID po per un mese nei pazienti leishmaniotici e si è dimostrato efficace nel controllare e ridurre i sintomi ed il titolo anticorpale²¹²

Durante i trattamenti farmacologici, è raccomandabile eseguire delle indagini di laboratorio (CBC, profilo biochimico, urinario) per monitorare l'andamento della terapia dopo un mese dall'inizio del trattamento e successivamente ogni 3-4 mesi.

Per le lesioni oculari, infine, è utile nei casi più gravi, associare ai trattamenti topici a base corticosteroidi, antibiotici e lubrificanti coeneali (colliri e pomate) anche la somministrazione di antibiotici per via sistemica.

Le linee guida recentemente pubblicate²¹³ riconoscono nell'associazione di Antimoniato di N-metilglucmina in associazione con Allopurinolo il trattamento di prima scelta per i soggetti negli stadi B,C, e D; mentre per quelli inquadrabili nello stadio E potrebbe essere considerato l'uso dei farmaci alternativi (tabella 10).

Nella tabella 10 sono illustrati i possibili protocolli terapeutici da utilizzare in prima, seconda e terza linea in corso di Leishmaniosi.

Current treatment protocols applied in canine leishmaniosis.

Protocol	Drugs and dosages	Main side effects	Reference
1st line	N-methylglucamine antimoniate ^a (75–100 mg/kg/SID) for 4–8 weeks, S.C. + allopurinol (10 mg/kg/BID) for at least 6–12 months P.O.	Potential nephrotoxicity and cutaneous abscesses/cellulitis (N-methylglucamine antimoniate)	Denerolle and Bourdoiseau (1999), Ikeda-Garcia et al. (2007) and Manna et al. (2008a)
		Xantine urolithiasis (allopurinol)	Cavaliero et al. (1999), Koutinas et al. (2001), Pennisi et al. (2005b) and Plevraki et al. (2006)
2nd line	Miltefosine ^a (2 mg/kg/SID) for 4 weeks P.O. + allopurinol (10 mg/kg/BID) for at least 6–12 months P.O.	Vomiting, diarrhea (Miltefosine)	Manna et al. (2008b) and Miró et al. (in press)
	Allopurinol (10 mg/kg/BID) for at least 6–12 months P.O.	Xantine urolithiasis	Cavaliero et al. (1999), Koutinas et al. (2001), Pennisi et al. (2005b) and Plevraki et al. (2006)
3rd line	Amphotericin B ^b (0.5–0.8 mg/kg, I.V./SID/twice per week) for 2 months	Nephrotoxicity	Lamothe (2001) and Cortadellas (2003)
	Liposomal amphotericin B ^b (3 mg/kg/SID) for 5 consecutive days, I.V.	Transient nephrotoxicity	Oliva et al. (1995)
	Metronidazole (25 mg/kg/SID) + spiramycin (150,000 U/SID) for 3 months P.O.	Not described	Pennisi et al. (2005a)
	Marbofloxacin (2 mg/kg/SID for 1 month P.O.)	Not described	Rougier et al. (2008)

P.O.: per os; S.C.: subcutaneous; I.V.: intravenous.

^a Registered for veterinary use in Europe.

^b 1st line drug for Human Visceral Leishmaniasis in Europe; not recommended by WHO for veterinary use, to avoid drug parasite resistance.

Tabella 10 (Solano-Gallego et al. 2009)

3.11 Profilassi

Si avvale di misure preventive di natura meccanica, come la dotazione dei locali di idonee zanzariere ed il ricovero in ambienti chiusi nelle ore di maggiore attività del pappatacio nei mesi in cui è presente, e chimica mediante l'uso di piretroidi sintetici in formulazioni spray, spot on, o collari.²¹⁴

3.11.1 Profilassi igienico-sanitaria

L'approccio più efficace nella prevenzione delle malattie infettive trasmesse da vettori è rappresentato da interventi sull'ambiente mirati ad avere un controllo sul vettore responsabile e sul contatto tra questo e l'ospite.

Contro la diffusione della Leishmaniosi è necessario, quindi, attuare:

- * interventi sulle condizioni igieniche complessive della popolazione;
- * interventi finalizzati alla lotta ai vettori;
- * interventi di bonifica dei serbatoi;
- * sensibilizzazione e informazione capillare dei proprietari.

Questo soprattutto alla luce degli ultimi dati che segnalano sia l'aumento, costante ed esponenziale, dell'insorgenza della malattia nell'uomo e nel cane sia la diffusione di quest'ultima in aree non costiere del bacino del Mediterraneo precedentemente considerate indenni.

Profilassi sanitaria ambientale

Si basa su misure igieniche generali preventive atte ad impedire la costituzione di nuovi focolai in cui è possibile lo sviluppo dei flebotomi (discariche, fogne, canali di scarico, siti di stoccaggio, ecc.).

Prevede l'esecuzione di frequenti interventi di disinfestazione in quei luoghi in cui è probabile rinvenire dei nidi mediante l'uso di trappole ed insetticidi a base di piretroidi sintetici, e la dotazione delle aperture dei locali di idonee zanzariere a maglie molto fitte (80-100 maglie/cm²), per impedire l'ingresso dei flebotomi

nei ricoveri, quest'ultime possono anche essere impregnate di piretroidi (deltamerina, ciflutrina).²¹⁵

Infine è di rilevante importanza evitare l'introduzione di soggetti infetti in aree indenni per evitare la comparsa di nuove sorgenti di malattia.

Profilassi sanitaria diretta rivolta ai flebotomi

Per limitare l'azione di tali insetti è possibile sia utilizzare delle trappole che attraggono il vettore, nelle vicinanze di fonti luminose, sia impiegare degli insetticidi.

Al contrario, è impossibile compiere interventi di bonifica delle aree interessate senza considerare le gravi ripercussioni sulla salute umana e animale in genere, e i eventuali dissesti ecologici conseguenti alla loro grande estensione.

Il controllo dei flebotomi, basato sull'impiego di insetticidi con ampio effetto residuale, continua ad essere uno dei principali strumenti disponibili nella prevenzione della Leishmaniosi. La ricerca di nuovi prodotti, formulati specificamente per essere applicati sugli animali domestici apre nuove prospettive nella lotta contro la Leishmaniosi Canina.

Le sostanze maggiormente utilizzate ed efficaci sono i piretroidi sintetici.^{216 217 218}

∞ DELTAMETRINA

Un collare impregnato da tale sostanza sembra avere un'azione repellente nei confronti del pappatacio della durata di 5 mesi, e nei confronti d'infestazioni da pulci e zecche rispettivamente per 4 mesi e 6 mesi.²¹⁹

∞ PERMETRINA

Da un recente studio²²⁰ è emersa l'efficacia di una soluzione topica di permetrina al 65% (744 mg/ml), nei confronti di *Phlebotomu perniciosus* per 28 giorni.

I risultati ottenuti dimostrano che l'applicazione mensile di una soluzione topica di permetrina è in grado di proteggere il cane dalle punture di *P. perniciosus*, e contestualmente, di eliminare una percentuale elevata, circa 61%, di questi insetti.

La permetrina si è dimostrata molto efficace anche contro altri insetti ematofagi.

Profilassi sanitaria indiretta rivolta al serbatoio

Rende necessario sia individuare i soggetti infetti sia sottoporli a terapia.

È fondamentale istituire una lotta al randagismo efficace.

È opportuno evitare che i cani soggiornino all'aperto in quelle ore in cui è più intensa l'attività del flebotomo (da un'ora prima del tramonto, alle prime ore del mattino, un'ora dopo l'alba), nei periodi in cui questo è presente maggiormente (maggio-settembre).

È possibile anche applicare ripetutamente sostanze repellenti direttamente sul pelo del cane (naturali -citronella-, e non -piretroidi-²²¹).

Infine, come misura profilattica, alcuni paesi obbligano all'eutanasia i soggetti infetti (randagi e non). Questo stampig out, praticato in termini giuridico-sanitari per le malattie altamente contagiose, consentirebbe l'uccisione in massa degli animali che costituiscono una minaccia per la salute pubblica. I risultati appaiono, però, controversi, e in ogni caso l'applicazione di tale azione per la Leishmaniosi non è priva di rischi data l'impossibilità individuare correttamente i soggetti che rappresentano un effettivo pericolo per l'uomo (sintomatici, asintomatici, sieropositivi, falsi negativi).

Nelle aree indenni, al contrario, è raccomandabile l'abbattimento dell'animale dal quale sia stato isolato il parassita, al fine di impedire l'infezione nei flebotomi e, quindi, l'instaurarsi di un ciclo autoctono con le conseguenti implicazioni per la salute dell'uomo e degli altri animali.

Le tabelle che seguono (11 e 12) riportano i dati relativi ad un recente studio condotto da Maroli et al, 2010.

Formulation	Country	No. of treated (control) dogs	Study duration	Reduction in proportion of dogs with leishmaniasis (%)	Reference No.
50% permethrin–10% imidacloprid (spot-on)	Italy	209* and 204† (218)	8 mo	89* and 93†	48
65% permethrin (spot-on)	Brazil	150 (146)	4 mo	50	49
	Italy	120 (188)	2 seasons	84	44
4% deltamethrin–triphenyl phosphate collar	Italy	354 (371)	2 seasons	50‡ and 86§	27
		49 (150)	1 season	52	42
		60 (60)	2 seasons	51	43
		119 (188)	2 seasons	84	44
	Tunisia	42 (32)	2 seasons	100	47
	Iran	466 (354)	6 mo	54	41
	Brazil	1,246 (1,267)	1 y	49	45
		Approx 900 (600)	1 y	58	c
		136 (97)	5 mo	50	46
		22,000 (0)	2 y	8.6¶	d

*Treatment applied once a month. †Treatment applied twice a month. ‡First sand fly season. §Second sand fly season. || A reduction in the incidence of zoonotic VL in humans was also observed (43%). ¶The prevalence of infection decreased from 12.5% in 2003 to 3.9% in 2005. There was a concomitant decrease in the incidence of leishmaniasis in humans from 34.1/100,000 to 5.4/100,000 over the same period.

^{c,d}Refer to footnotes.

Tabella 11 (Maroli et al, 2010)

Mode of application	Commercial product	Active ingredient	Interval to action after application	Estimated duration of protection
Spot-on	Advantix ^a	50% permethrin and 10% imidacloprid	24–48 h	3 wk
Spot-on	Exspot ^e	65% permethrin	24–48 h	4 wk
Spray	Duowin ^f	2% permethrin and 0.2% pyriproxyfen	Immediate	3 wk
Collar	Scalibor ^e	4% deltamethrin and triphenyl phosphate	1 wk	5 mo

Tabella 12 (Maroli et al, 2010)

3.11.2 Profilassi vaccinale

La sperimentazione clinica di un vaccino passa attraverso vari passaggi, in genere distinti in quattro fasi GCP (Good Clinical Practice).

Fase 1: è la fase in cui si dà una prima valutazione sulla sicurezza del prodotto sugli animali cui il vaccino è destinato, ed anche la fase in cui se ne studia la farmaco-cinetica. In questa fase è possibile rilevare gli effetti indesiderati della sostanza in funzione del dosaggio. Se il vaccino dimostra di non essere tossico o di esserlo in maniera accettabile passa alla fase successiva.

Fase 2: è la fase in cui si valuta l'efficacia immunologica del vaccino ad un preciso dosaggio e somministrazione, mediante misurazione della risposta immunitaria T cellulare in un numero limitato di soggetti.

Fase 3: è la fase a cui si accede se la due ha dato risultati promettenti, pertanto la misurazione della risposta immunitaria si estende a più soggetti, al fine di approfondire i dati di efficacia protettiva del vaccino, di valutare il dosaggio migliore, e di monitorare gli effetti collaterali eventualmente riscontrabili su di un campione statisticamente più significativo. La durata di tale periodo è variabile.

Fase 4: è destinata ai prodotti che superano con successo le precedenti fasi e previa commercializzazione del prodotto ed è rivolta a confermare la sicurezza e tollerabilità del vaccino a lungo termine su un ampio numero di pazienti.

3.11.2.1 Molecole vaccinali sperimentate contro la leishmaniosi canina²²²

Tenendo conto dell'andamento cronologico delle sperimentazioni e delle caratteristiche biologiche dei vaccini, le molecole vaccinali sperimentate per la leishmaniosi canina vengono suddivisi in tre categorie²²³ (Tabella 13). In questo paragrafo verranno descritte le caratteristiche delle diverse categorie e, quando presenti, le molecole sperimentate nel cane.

Vaccini di I° generazione	Vaccini di II° generazione	Vaccini di III° generazione
Parassiti uccisi	Vaccini vivi modificati	Vaccini a DNA
Lisati di parassiti autoclavati	Vaccini che usano batteri e virus come carrier di antigeni	Vaccini basati sulla saliva di antigeni di flebotomi
Mix di parassiti vivi ed uccisi	Antigeni purificati di <i>Leishmania</i>	Vaccini sintetici
	Agenti ricombinanti	

Tabella 13

Vaccini di I generazione. I vaccini di prima generazione sono i più vecchi e attualmente sono utilizzati in zone del mondo particolarmente depresse dal punto di vista economico in quanto sono facili da preparare e poco costosi. Inoltre, tra i vaccini di I generazione gli autoclavati si sono dimostrati abbastanza stabili anche a temperature ambientali elevate, questa è una caratteristica che diventa di fondamentale importanza proprio nei Paesi più poveri dove spesso non è possibile rispettare la catena del freddo. L'efficacia profilattica di questi vaccini consiste esclusivamente, e non in tutti gli individui, in una attenuazione nello sviluppo di forme cutanee particolarmente aggressive. In questa categoria, pertanto, sono compresi vaccini testati per la protezione delle forme cutanee umane antroponotiche e zoonotiche, sia nel vecchio (*L. tropica*, *L. major*) che nel nuovo mondo (complesso *L. mexicana*).

Vaccini di prima generazione sono stati usati anche per proteggere il cane dalla leishmaniosi viscerale. Un vaccino di questo tipo, allestito da *Leishmania major* mixata con un adiuvante (BCG), ha fornito risultati discordanti, dimostrandosi

efficace in uno studio condotto in Iran²²⁴, privo di efficacia in un precedente studio condotto in Brasile²²⁵.

Allo stato attuale, in Brasile è commercializzato un vaccino di prima generazione da utilizzare esclusivamente in associazione alla terapia con antimoniale nel trattamento di forme cutanee e muco cutanee. Questa associazione ha mostrato una efficacia che varia dal 35,5 al 69,3 %.

Vaccini di II generazione. Rientrano in questa in questa categoria i vaccini vivi modificati, i vaccini che usano batteri o virus geneticamente modificati come veicoli, i vaccini basati su antigeni purificati di *Leishmania* e gli agenti ricombinanti.

Vaccini vivi modificati o deleti: Come anticipato più sopra, la possibilità di sfruttare le moderne biotecnologie molecolari per creare delle *Leishmania knock-out* ha aperto la strada a promettenti strategie vaccinali. Alcuni di questi vaccini sono stati realizzati mediante delezione di alcuni geni di *Leishmania* responsabili della sintesi degli enzimi diidrofolato reduttasi-timidilato sintasi²²⁶, cisteina-proteinasi^{227 228} (Souza et al., 1994; Alexander et al., 1998), o della pteridina reduttasi²²⁹ (Papadopoulou et al., 2002). I parassiti così deleti vanno incontro ad un ciclo vitale breve, ma sufficiente a generare una risposta immune specifica causando un'infezione abortiva senza determinare malattia. Un altro approccio consiste nell'introdurre nel genoma di *Leishmania* dei geni che ne determinano il 'suicidio', oppure geni che determinano la sensibilità a determinati farmaci, così come fatto in *L. major* introducendo il gene timidina chinasi dell'Herpes virus I sensibile al ganciclovir²³⁰ (Muyombwe et al., 1998) o il gene citosina deaminasi di *Saccharomyces cerevisiae* sensibile alla 5-fluorocitosina²³¹ (Davoudi et al., 2005).

Vaccini che usano batteri o virus geneticamente modificati come veicoli (vaccini ricombinanti vivi): questi vaccini sono capaci di esprimere antigeni parassitari ad elevato potere immunogeno nell'organismo ospite e stimolare il sistema

immune da parte degli stessi microrganismi usati come carrier. Al momento questi vaccini hanno avuto un'applicazione pratica limitata. Esempi di vettori batterici sono *Salmonella typhimurium* e BCG ai quali viene fatto esprimere il gene GP63 (proteasi di superficie) di *L. major*^{232233 234}, ad un mutante di BCG viene fatto esprimere il gene LCR1 (proteina flagellare) di *L. chagasi*²³⁵ a tachizoiti attenuati di *Toxoplasma gondii* viene fatto esprimere il gene KMP-11 (antigene del kinetoplasto)²³⁶.

Il vettore virale 'vaccinia virus' è stato utilizzato per fargli esprimere le proteine di superficie G46/M-2/PSA-2 della forma promastigote di *L. amazonensis*²³⁷ (McMahon et al., 1993), o l'antigene LACK che sembra essere promettente nel proteggere i topi contro *L. major*²³⁸ (Gonzalo et al., 2002) e i cani contro l'infezione da *L. infantum*²³⁹ (Ramiro et al., 2003).

Vaccini basati su antigeni purificati: due molecole vaccinali e i relativi vaccini rientranti in questa categoria sono stati sperimentati nella fase III mostrando dei risultati molto promettenti.

Una delle due molecole è rappresentata dal *fucose mannose ligant* (FML), utilizzato insieme all'adiuvante saponina (116-118). Il FML è un complesso glicoproteico, presente sui promastigoti e sugli amastigoti di *Leishmania donovani*, che partecipa nell'interazione tra il parassita e i macrofagi dell'ospite in maniera specie-specifica²⁴⁰ (Palatnik-de-Sousa et al., 1995). Questa molecola ha dimostrato la sua attività antigenica nell'uomo e nel cane²⁴¹. Inoltre, è risultata immunogena, immunoprofilattica e immunoterapeutica, in prove di campo, nel topo, nell'hamster e nel cane^{242 243}. Il vaccino caratterizzato da questa molecola è il Leishmune[®], prodotto dalla Fort Dodge Animal HealthTM e autorizzato dal Ministero dell'Agricoltura Brasiliano, è anche il primo vaccino contro la leishmaniosi viscerale canina²⁴⁴. Leishmune[®] nel trial di fase III ha mostrato di avere un effetto protettivo significativo nel cane con una efficacia fino all'80%, efficacia che secondo gli autori è diretta ad evitare severe forme cliniche²⁴⁵. Quando usato ad una concentrazione doppia di adiuvante il vaccino si è

dimostrato anche immunoterapeutico sia per i cani infettati naturalmente²⁴⁶ (Borja Cabrera et al., 2004) che per i cani infettati sperimentalmente²⁴⁷ (Santos et al., 2007) con *Leishmania chagasi*.

L'altra molecola che si è dimostrata promettente in chiave vaccinale è l'antigene LiESAp (oggetto della seguente sperimentazione) un prodotto di escrezione/secrezione ottenuto dalla purificazione di amastigoti di *L. infantum* addizionato con muramyl dipeptide (MDP) come adiuvante.²⁴⁸ (Lemestre 2005, 2007)

Antigeni ricombinanti: proteine ricombinanti da sole o in combinazione, associate ad adiuvanti o veicoli batteri, sono state sperimentate nel modello murino e nel cane. Tra gli antigeni ricombinanti che hanno dato risultati promettenti nel cane in fase II, ma che necessitano di ulteriori sperimentazioni in campo, si possono citare quelli sperimentati da Moreno e collaboratori ossia l'istone 1 (H1) e la proteina idrofilica acilata di superficie B1 (HASPB1) singolarmente, oppure insieme con MontanideTM, e la poliproteina MML utilizzando come adiuvante MPL[®]-SE.²⁴⁹ (Moreno J et al., 2007)

A differenza delle molecole sopra citate, in questa categoria di vaccini vi è una proteina chimerica (Leish-111f) formata dall'unione di tre antigeni di *Leishmania* (TSA; LmSTI1; LeIF) che è stata l'unica provata in fase III in Italia su 45 cani beagle, ma che purtroppo non ha mostrato, sul campo, una efficacia protettiva soddisfacente.²⁵⁰ (Gradoni et al., 2005)

Vaccini di III generazione

Vaccini a DNA: Numerosi antigeni sono stati testati allo scopo, soprattutto negli animali di laboratorio (topo su tutti gli altri). Nel cane sono stati testati i geni codificanti per i seguenti antigeni: HPB-LACK da *L. infantum* (adiuvante: pCIneo, vettore: Vaccinia Virus)²⁵¹ (Ramiro et al., 2003); HPB CPa e CPba da *L. infantum* (adiuvanti: pCB6+ Montanide 720 and CPG)²⁵² (Rafati et al., 2005); KMPII, TRYP, LACK and GP63 da *L. infantum* (adiuvante: pMOK)²⁵³

(Rodríguez-Cortés et al., 2007); NH36 da *L. chagasi* (adiuvante: VR1012)²⁵⁴ (Borja Cabrera et al., 2007). Tutti questi vaccini non hanno ancora superato la Fase II e, sebbene a diverso titolo, sembrano essere piuttosto promettenti.

Vaccini basati su antigeni della saliva dei flebotomi: è noto che la saliva dei flebotomi contiene molecole biologicamente attive con attività anti-aggregante piastrinica, vasodilatatrice e di promozione della diffusione del parassita nei tessuti (ialuronidasi)²⁵⁵. Tenendo conto di ciò sono stati sperimentati nel topo due vaccini (MAXADILAN e anti- SP15 ottenuti da *Phlebotomus papatasi*) che nonostante abbiano mostrato una discreta efficacia, necessitano naturalmente di altri studi²⁵⁶.

Vaccini sintetici: sostanzialmente si tratta più di una strategia da sviluppare che non di una realtà già perseguita. Negli ultimi anni si è appurato che i linfociti T CD4+ e CD8+ giocano un ruolo importante sia nella difesa dalla leishmaniosi che nella sua cura identificare molecole capaci di stimolare efficacemente questi citotipi cellulari, potrà costituire la base per lo sviluppo di vaccini sintetici adeguati.

4. Parte sperimentale

4.1 Introduzione

Nell'ultimo decennio l'incidenza della Leishmaniosi, sia nel cane sia nell'uomo, è apparsa in netto aumento.

L'attenzione degli studiosi che si interessano dell'argomento è oggi rivolta soprattutto all'immunoterapia e alla profilassi vaccinale; senza naturalmente trascurare l'interessantissimo filone di ricerca volto alla messa a punto di sostanze utilizzabili nei confronti dei flebotomi. Diversi esperimenti vaccinali sono in corso in varie parti del mondo anche se, almeno per quanto riguarda la specie canina, nonostante risultati positivi sperimentali incoraggianti, non sono stati ancora messi a punto dei protocolli utilizzabili nella pratica professionale. Le molecole di seconda generazione hanno dato risultati soddisfacenti ponendo buone basi per le sperimentazioni future. Tra queste molecole il "LiESAp", addizionato con muramyl dipeptide (MDP) come adiuvante, ha prodotto risultati soddisfacenti, tuttavia la bassa incidenza di malattia durante il periodo di sperimentazione pone in dubbio la reale efficacia del vaccino. Proprio da quest'ultima considerazione prende corpo l'idea di sperimentare un vaccino "analogo" al "LiESAp" in una zona del sud Italia ad endemia notoriamente elevata: Santa Anastasia [prevalenza di Leishmaniosi canina pari al 40,4%²⁵⁷].

Lo studio ha lo scopo di verificare l'efficacia protettiva di tale vaccino addizionato con adiuvante (non divulgabile) nei confronti dell'infezione dello sviluppo della malattia indotte da *Leishmania infantum* in cani naturalmente esposti in zona endemica. E' utile ricordare, come recentemente descritto da Paltrinieri²⁵⁸ e Coll. (tabella 14) che per malato si intende un soggetto infetto in cui la Leishmaniosi è clinicamente evidente.

Tabella 14: Stadiazione dei cani affetti da Leishmaniosi

Stage of leishmaniasis	Features
A: Exposed	Includes dogs with negative cytologic, histologic, parasitological, and molecular findings and low-titer ³ antibodies against <i>Leishmania</i> spp. Dogs are clinically normal or have signs associated with other diseases. Usually, dogs in this category are those living or that have lived during 1 or more transmission seasons in a geographic region in which the presence of <i>Leishmania</i> vectors (sand flies) has been confirmed.
B: Infected	Includes dogs in which parasites have been detected through direct diagnostic methods (eg, microscopic evaluation, organism culture, or PCR assay) and with low-titer ³ antibodies against <i>Leishmania</i> spp. Dogs are clinically normal or have signs associated with other diseases. In endemic areas, detection of <i>Leishmania</i> DNA via PCR assay in skin or peripherally obtained blood samples collected during the infection transmission period, in the absence of evident lesions, may not be sufficient to consider a dog infected.
C: Sick (clinically evident disease)	Includes dogs with positive cytologic results regardless of serologic results, dogs with high antibody titers ³ against <i>Leishmania</i> spp, and rarely, infected dogs. One or more clinical signs common to leishmaniasis are present. ³ Given the varied clinical manifestations of the disease, observed signs suggestive of disease can differ from the common clinical signs, as long as they can be clearly associated with ongoing infection. When physical examination does not reveal clinical signs, dogs in this category should still be defined as sick when hematologic, biochemical, and urinary alterations common to leishmaniasis ³ are detected. Laboratory changes other than those considered common can also be indicative of disease, provided that they are associated with the infection.
D: Severely sick	Includes sick dogs with severe clinical illness, as indicated by 1 of the following: evidence of proteinuric nephropathy or chronic renal failure; presence of concurrent problems (eg, ocular disease causing functional loss or joint disease impairing mobility) related or unrelated to leishmaniasis that require immunosuppressive treatment; severe concomitant conditions including various coinfections or neoplastic, endocrine, or metabolic diseases; and clinical unresponsiveness to repeated courses of anti- <i>Leishmania</i> drugs.
E-a: Sick-unresponsive	Includes sick dogs unresponsive to recommended anti- <i>Leishmania</i> treatment.
E-b: Sick-early relapse	Includes sick dogs treated in accordance with the recommended anti- <i>Leishmania</i> protocol but that relapse soon after treatment ceases.

A questa categoria appartengono i cani che esprimono sintomatologia riportabile a *L. infantum*, in cui la citologia risulta positiva indipendentemente dai test sierologici che nella stragrande maggioranza dei casi risultano alti o crescenti nel tempo.

Date le manifestazioni aspecifiche della Leishmaniosi i segni indicativi della patologia possono essere diversi da quelli elencati.

In assenza di segni valutabili al solo esame fisico, un cane deve essere considerato malato quando manifesti alterazioni ematologiche, biochimiche e urinarie che suggeriscono la presenza della Leishmaniosi.

Per cane gravemente malato si intende un soggetto in condizioni cliniche severe: -nefropatia proteinurica o insufficienza renale cronica, problemi oculari causanti perdita funzionale della vista ed alterazioni articolari che impediscono la

mobilità correlabili o meno alla Leishmaniosi e che richiedono un trattamento immunosoppressivo;

-presenza di condizioni concomitanti, incluse varie coinfezioni, malattie neoplastiche, endocrine o metaboliche e la mancata risposta clinica a ripetuti trattamenti terapeutici a base di farmaci antileishmania.

Nella presente tesi sarà valutata in particolare l'efficacia del vaccino nei confronti dello sviluppo della malattia. L'efficacia del vaccino nei confronti dell'attecchimento dell'infezione sarà oggetto della tesi di dottorato svolta dalla dottoressa Paparcone Rossella. Data la natura strettamente correlata delle due sperimentazioni, sarà inevitabile la presenza di alcuni punti di sovrapposizione, soprattutto nella descrizione delle metodiche, tra i due lavori di tesi.

Nel presente studio, inoltre, è stata anche valutata l'infettività di un campione di soggetti infetti e malati, attraverso prova xenobiotica.

Prima di descrivere le metodologie d'indagine seguite nello studio si ritiene utile fornire una breve descrizione del prodotto immunizzante già testato e descritto in letteratura..

4.1.1 Caratteristiche del vaccino

La molecola LiESAp è un prodotto di escrezione/secrezione ottenuto dalla purificazione di amastigoti di *L. infantum* addizionato con muramyl dipeptide (MDP) come adiuvante. I promastigoti di un ceppo di *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) sono stati coltivati in un terreno di coltura (CDM/LP) (Marlen et al., 1999; Lemesre 1994). Quando la concentrazione parassitaria raggiungeva il valore di $2-3 \times 10^7$ promastigoti per millilitro nel periodo di sei giorni, la coltura veniva centrifugata (2000 g, 20 min, 4°C) per rimuovere i parassiti. Il sopranatante veniva raccolto, filtrato (filtri con pori delle dimensioni di 0,2 micron, Millipore, Billerica, MA, USA) per eliminare i promastigoti asportati, concentrati approssimativamente cento volte e dializzati

mediante ultrafiltrazione con un filtro 3-kDa-cutoff (Pal). La concentrazione proteica veniva determinata con il metodo di Bradford (Bio-Rad, Laboratories). Il placebo era ottenuto da colture prive di parassiti e processate come descritto per il sopranatante delle colture parassitate (Lemestre 2005). Il vaccino LiESAp ha dato risultati soddisfacenti sia in uno studio condotto presso la National Veterinary School of Lyon (Francia), studio condotto su 18 cani di razza beagle infettati sperimentalmente mediante inoculazione intravenosa di promastigoti di *L. infantum* (Lemesre 2005), che in un successivo studio molto più ampio condotto su circa 400 cani residenti in area endemica alla leishmaniosi canina nel Sud della Francia (Lemesre 2007). In quest'ultimo studio il vaccino ha mostrato di possedere una efficacia del 92%, però tali risultati risentono in maniera fortemente negativa della scarsissima incidenza registrata nei due anni di follow-up che non consente di trarre conclusioni definitive sulla reale efficacia del vaccino. Per questo motivo il vaccino è stato sperimentato in Italia in area considerata ad alto tasso di endemia per la leishmaniosi canina, con alcune modifiche rispetto al prodotto originale.

4.2 Natura e obiettivo dello studio

L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare l'efficacia del vaccino analogo al LiESAp in cani mantenuti in un contesto naturale.

4.3. Summary of the trial

La sperimentazione è stata divisa in due fasi:

✓ Prima fase o fase vaccinale:

- ventitre cani di sei mesi, nati in pieno inverno e provenienti da una regione non endemica per leishmaniosi sono stati immunizzati con una serie di tre iniezioni di vaccino ad intervalli di tre settimane;
- venti cani di sei mesi non sono stati vaccinati e sono stati utilizzati come gruppo di controllo;

- durante tutta questa fase sono stati effettuati prelievi di sangue per eseguire analisi sierologiche, volte a definire l'immunogenicità del prodotto da testare.
- ✓ Seconda fase o fase di contagio naturale:
- tutti i cani (n=43) hanno soggiornato in un'area endemica per la leishmaniosi in Italia (Napoli-area vesuviana) per essere esposti ad un'infezione naturale (flebotomi) di *Leishmania infantum*;
 - questa fase d'infezione è durata più di 2 anni per esporre i cani alle punture dei flebotomi per due stagioni consecutive;
 - anche in questo periodo sono stati eseguiti prelievi ematici prima e durante la fase d'infezione per l'esecuzione di analisi sierologiche e per individuare la presenza del parassita.

4.4. Materiali e metodi

4.4.1 Animali

Razza:	Bearle
Provenienza dei cani :	area non endemica
Stato sanitario :	Vaccinati e non durante la fase 1 dello studio al Nerviano Medical Sciences- viale Pasteur, 10-20014 Nerviano
Numero dei cani :	43
Sesso :	50% maschi e 50% femmine
Età :	6 mesi
Identificazione dei cani:	mediante tatuaggio e microchip

4.4.2 Gruppi

Durante la prima fase dello studio, 43 cani sono stati trattati come segue:

- gruppo 1: gruppo vaccinato: 23 cani, di sei mesi d'età sono stati vaccinati per via sottocutanea per tre volte, ad intervalli di tre settimane.
- gruppo 2: gruppo di controllo: 20 cani, di sei mesi, non sono stati sottoposti a vaccinazione e sono stati utilizzati per i controlli.
- Il trial ha previsto una vaccinazione di richiamo ad un anno di distanza dalla terza.

4.4.3 Alloggio

- Dopo il loro arrivo gli animali sono stati mantenuti in ricoveri all'aperto per tutta la durata dell'esperimento presso un canile sito in un comune (Sant' Anastasia-Napoli) dell'area vesuviana (figura 14), area scelta per l'alta incidenza di Leishmaniosi umana e canina rilevata.²⁵⁹ Le femmine adulte dei flebotomi, in tale area, sono attive dalla fine di maggio alla fine di ottobre.

- La cura degli animali e la somministrazione del cibo è stata effettuata una volta al giorno rispettando la pratica seguita in questi allevamenti canini.
- Prima di eseguire la raccolta dei campioni si è atteso un periodo di acclimatamento di 7 giorni.

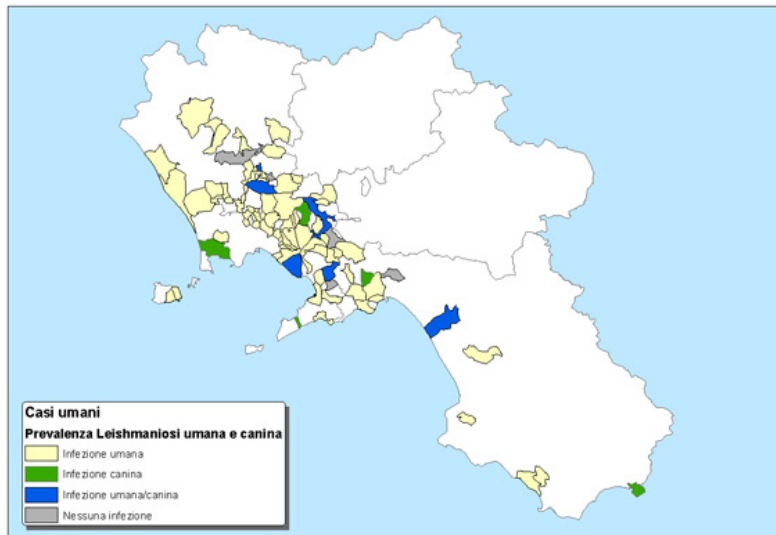


Figura 14 Distribuzione dell'infezione leishmanica umana e canina in Campania. Cappiello S., 2008. Studi longitudinali in gruppi placebo di trial vaccinali per Leishmaniosi canina in Italia. Parte I: rilievi clinici ed epidemiologici. Tesi di

dottorato di ricerca in scienze cliniche e farmaco-tossicologiche veterinarie, indirizzo di medicina interna degli animali domestici.



Figura 15: Fotografia aerea GIS dell'area vesuviana²⁶⁰

4.4.4 Seconda fase

Lo schema di questa fase viene sintetizzato nella tabella 15.

Tabella 15 ANALISI EFFETTUATE				
Data	Prelievi effettuati	Analisi di laboratorio (Dipartimento MIPI)	Analisi di laboratorio (Università di Napoli)	Analisi di laboratorio (Francia)
M0	Visita clinica - prelievi ematici - aspirato midollare e linfonodale	Coltura linfonodale - estrazione Dna dal campione midollare - n-PCR midollare - IFAT	Profilo biochimico ed ematologico	PCR-Real time Sierologia vaccinale
M3	Visita clinica – prelievi ematici	IFAT	Profilo biochimico ed ematologico	Sierologia vaccinale
M6	Visita clinica - prelievi ematici	IFAT	Profilo biochimico ed ematologico	
M9	Visita clinica - prelievi ematici - aspirato midollare e linfonodale	Coltura linfonodale - estrazione Dna dal campione midollare - n-PCR midollare - IFAT T	Profilo biochimico ed ematologico	PCR-Real time Sierologia vaccinale
M12	Visita clinica - prelievi ematici	IFAT	Profilo biochimico ed ematologico	
M15	Visita clinica - prelievi ematici	IFAT	Profilo biochimico ed ematologico	
M18	Visita clinica - prelievi ematici - aspirato midollare e linfonodale	Coltura linfonodale - estrazione Dna dal campione midollare - n-PCR midollare - IFAT	Profilo biochimico ed ematologico	PCR-Real time Sierologia vaccinale
M21	Visita clinica - prelievi ematici	IFAT	Profilo biochimico ed ematologico	
M24	Visita clinica - prelievi ematici - aspirato midollare e linfonodale	Coltura linfonodale - estrazione Dna dal campione midollare - n-PCR midollare - IFAT	Profilo biochimico ed ematologico	PCR-Real time Sierologia vaccinale
M27	Visita clinica - prelievi ematici	IFAT	Profilo biochimico ed ematologico	
M30	Visita clinica - prelievi ematici - aspirato midollare e linfonodale	Coltura linfonodale - estrazione Dna dal campione midollare - n-PCR midollare - IFAT	Profilo biochimico ed ematologico	PCR-Real time Sierologia vaccinale
M33	Visita clinica – prelievi ematici	IFAT	Profilo biochimico ed ematologico	
	<u>M= mese</u> <u>IFAT= immunofluorescenza indiretta</u> <u>N-PCR=nested PCR</u>			

4.4.4.1 Check up completo

Dopo il primo controllo completo eseguito dopo l'arrivo degli animali (M0), ne sono stati effettuati altri dopo 9, 18 e 24, 27, 30 e 33 mesi (M9, M18, M24, M27, M30, M33) che hanno previsto:

1. una valutazione clinica degli animali;
2. la valutazione dei dati di laboratorio (Full Body Count, PT, PCR su prelievo midollare, isolamento del parassita mediante coltura dell'aspirato linfonodale popliteo, Sierologia Vaccinale, IFAT). (scheda 1)

4.4.4.2 Check up parziale:

La valutazione clinica, il peso di tutti i soggetti, la valutazione dei dati di laboratorio, la determinazione del titolo IFAT e della sierologia vaccinale sono stati eseguiti al mese 3, 6, 12, 15, 21, 27, e 33.

TATTOO NUMBER

GROUP

TIME	DATE	IFAT (titer)	PCR (Pos/Neg)	PARASITE CULTURE (Pos/Neg)	TOTAL PROTEIN	ALBUMIN/ GLOBULIN RATIO	WBC (G/L)	RBC (G/L)	PLATELETS (G/L)	COMMENTS
M0										
M3			ND	ND						
M6			ND	ND						
M9										
M12			ND	ND						
M15			ND	ND						
M18										
M21			ND	ND						
M24										
M27										
M30										
M33										

PARAPH

Scheda1

4.4.5 Follow up clinico

Mediante un'osservazione quotidiana i cani sono stati controllati per valutare la comparsa di qualsiasi comportamento anomalo o la comparsa di sintomi.

4.4.5.1 Valutazione clinica:

Le valutazioni cliniche prevedevano un'accurata ispezione dei cani per la ricerca della presenza di uno o più di sette segni attribuibili all'infezione da leishmania e sono state eseguite ogni tre mesi per tutta la durata dello studio.

dermatiti
ulcere cutanee
alopecia
lesioni oculari
adenopatia linfonodale
onicogrifosi
perdita di peso

In base al numero dei segni clinici è stato stabilito un punteggio da 0 a tre (severo).

Tutti questi controlli sono stati registrati su una scheda clinica individuale. (scheda 2)

Scheda 2: Scheda clinica individuale

ORGAN OR DISORDERS	TROUBLES	GRADING		
BCS	Weight loss (kg)	None <input type="checkbox"/>	Mild <input type="checkbox"/>	Severe <input type="checkbox"/>
Skin	Ulcers/ Nodules	None		Yes
	Alopecia	None	Mild	Severe
	Furfur	None	Mild	Severe
	Onychogryphosis	None		Yes
Sensorial disorders	/	Normal	Depression	Convulsion
Mucosae	/	Normal	Pallor	Jaundice
Lymph Nodes and spleen	Mandibular	Normal <input type="checkbox"/>		Enlarged <input type="checkbox"/>
	Pre-scapular	Normal		Enlarged
	Popliteal	Normal		Enlarged
	Spleen	Normal		Enlarged
General conditions	Pu/Pd	None		Yes
	Anorexia	None		Yes
	Diarrhoea	None		Yes
	Vomiting	None		Yes
Eyes	Blepharitis	None		Yes
	Conjunctivitis	None		Yes
	Keratitis	None		Yes
	Uveitis	None		Yes
Articulations	Arthritis	None		Yes

I certify that all the information are complete and exact

Dr (Paraph and date) : _____

4.4.6 Trattamenti non consentiti

Durante tutto il periodo della sperimentazione non è stato possibile trattare i soggetti con farmaci antiparassitari o con repellenti (Piretroidi) contro i flebotomi come la Deltamerina e la Permetrina.

Sono stati altresì vietati trattamenti con i farmaci contro la leishmania come l'Amfotericina B, l'Allopurinolo, il Metronidazolo, il Ketoconazolo, l'Itraconazolo, ecc., e tutti i farmaci capaci di influenzare la risposta immunitaria, come i corticosteroidi ad esempio, sono stati somministrati al bisogno e sotto stretta osservazione. Questi trattamenti sono stati registrati nella scheda n.3.

Scheda n.3

TATTOO :

GROUP :

DATE :

DESCRIPTION :

.....
.....
.....
.....

TREATMENT

none

yes

In case of treatment, specify it (dosage, duration...) :

.....
.....
.....
.....
.....
.....

COMMENTS:

.....
.....
.....
.....

Dr (Paraph and date) _____

4.4.7 Trattamenti antiparassitari

4.4.7.1 Trattamenti contro le zecche

Trattamenti ambientali contro le zecche sono stati effettuati nell'area in cui hanno soggiornato i cani regolarmente.

I collari antiparassitari non sono stati utilizzati a causa della loro possibile influenza sui flebotomi.

Qualora qualche soggetto sia risultato positivo all'Ehrlichiosi è stato trattato con Doxiciclina o medicinali equivalenti. Tutti questi trattamenti sono stati registrati nelle schede individuali previste dal protocollo.

4.4.7.2 Trattamenti antielmintici

Ogni sei mesi i cani sono stati sottoposti a trattamenti antiparassitari regolarmente per evitare che l'insorgenza di infezioni parassitarie potesse interferire con la risposta immunitaria.(scheda n. 4)

4.4.8 DHPP vaccinazione

I soggetti annualmente sono stati regolarmente vaccinati (Canigen®-Virbac) contro le infezioni causate dai virus del Cimurro, della Rabbia, della Leptospirosi, della Parainfluenza e contro l'Adenovirus ed il Parvovirus. (scheda n. 4)

TATTOO :

GROUP :

CONCOMITANT TREATMENTS

1/ ANNUAL DHPPi/LR BOOSTER

Vaccine	Batch number	Comments (posology, administration route, duration of treatment,...)	Date	Paraph
DHPPi/LR			... / ... / ...	
			... / ... / ...	

2/ DEWORMING

Active ingredient	Registered name	Comments	Date	Paraph
OXIBENDAZOLE	VITAMINHE		... / ... / ...	
			... / ... / ...	
			... / ... / ...	
			... / ... / ...	
			... / ... / ...	
			... / ... / ...	
			... / ... / ...	
			... / ... / ...	
			... / ... / ...	
			... / ... / ...	

I certify that the information presented here above is complete and exact.

Dr (Paraph and date) : _____

Scheda n. 4

4.4.9 Campioni

4.4.9.1 Identificazione dei campioni

Ogni campione è stato identificato con il codice dello studio, la data, il numero del tatuaggio del cane e la natura del campione (S=siero, BM= aspirato midollare, B= sangue in EDTA, D= DNA). i campioni sono stati esaminati dal dipartimento MIPI (ISS).

F-136.010000-58054

Date :

Tattoo :

Sample :

TIME : _____ **SAMPLING SPECIFICATION**

DATE : _____ Uncoated tubes

TATTOO : _____ EDTA tube

TEMPERATURE (°C) : _____ Bone marrow
puncture

WEIGHT (KG) : _____ Lymph node aspirates

Comments :

4.4.9.2 Campioni di sangue

Sono stati raccolti per entrambi i gruppi.

Da ogni cane sono stati prelevati approssimativamente tre ml di sangue successivamente sierato e ripartito in tre aliquote non filtrate o deplementate, le aliquote sono state congelate e mantenute ad una temperatura inferiore ai 15 gradi.

Le tre aliquote sono state distribuite come segue:

3. due aliquote di siero sono state inviate ed analizzate dal laboratorio del Dipartimento di Malattie Infettive ed Immunomediate dell'Istituto Superiore di Sanità, Roma.
4. di questi campioni uno è stato utilizzato per la determinazione del titolo IFAT e l'altro usato per la determinazione sierologica del vaccino;
5. la terza è stata utilizzata per un controllo biochimico eseguito presso la Facoltà di Medicina Veterinaria di Napoli.

4.4.9.2.1 Campioni di sangue in EDTA

I prelievi di sangue sono stati raccolti in provette contenenti EDTA al mese 0, 3, 6, 9, 18, 24, 27, 30 e 33 per entrambi i gruppi.

È stato raccolto da ogni cane un volume di 2 ml, le provette sono state conservate a temperatura ambiente ed utilizzate per eseguire analisi ematologiche presso l'Università Di Napoli

4.4.9.3 Ago-aspirato midollare

Al mese 0, 9, 18, 24, e 30 è stato eseguito l'ago-aspirato midollare a tutti i soggetti dello studio.

L'aspirato di sangue ed i frustuli midollari sono stati ottenuti mediante sternomiocentesi, effettuata con siringa da 10 ml, munita di ago rosa da 18G, dalla seconda o terza sternebra tenendo l'animale in posizione latero-laterale con l'arto superiore flesso. Il materiale midollare veniva ottenuto per aspirazione lenta fino ad un volume di circa 0,5 ml e raccolto in provette contenenti EDTA. Le provette sono state conservate tra i due e gli 8 gradi o in mancanza di refrigerazione a temperatura ambiente.

Il materiale è stato utilizzato per l'estrazione del DNA per la n-PCR.

4.4.9.4 Aspirato linfonodale popliteale

L'aspirato linfonodale è stato eseguito dal linfonodo popliteo, il materiale raccolto è stato conservato in provette contenente EDTA. A mese 0, 9, 18, 24 e 30 in entrambi i gruppi.

Individuati, mediante palpazione, i linfonodi poplitei e prescapolari venivano esposti in posizione superficiale sottocutanea mediante pressione digitale provvedendo alla tosatura del pelo e detersione della zona cutanea esposta. L'ago di una siringa da 2,5 ml contenente 0,5 ml di soluzione fisiologica sterile, 500 nanol di penicillina e di streptomicina, veniva delicatamente infisso all'interno del linfonodo e la soluzione spinta con forza nel ganglio. Dopo aver fatto scorrere più volte l'ago al suo interno, in modo da provocare la rottura del tessuto linfatico, il materiale veniva aspirato ottenendo una sospensione ricca di frustuli utilizzata per la semina in appositi terreni di coltura in condizioni di massima asepsi.

I campioni sono stati conservati a temperatura ambiente.

4.4.10 Sierologia IFAT

Gli anticorpi contro la *Leishmania Infantum* sono stati rilevati attraverso la tecnica IFAT descritta nell'articolo "Incidence and time course of *Leishmania Infantum* infections examined by parasitological, serologic and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to 3 consecutive transmission seasons" di Oliva et al. Journal of clinical microbiology, 2006, p.1318-1322.

L'antigene utilizzato per l'esame era costituito da promastigoti di *L. infantum*, ceppo di riferimento OMS MHOM/TN/80/IPT1 (codice rapido di laboratorio: IPT1), coltivati in EMTM a 22°C. I parassiti, prelevati da tubi di terreno seminati da 3-4 giorni, venivano lavati 3 volte in PBS pH=7,2 a 2.400 rpm per 20 min. La sospensione, aggiustata ad una apposita concentrazione, veniva apposta sotto forma di goccia da 25 ml su vetrini multi-spot (Sanofi Diagnostics

Pasteur). Le gocce, seccate a temperatura ambiente, venivano fissate con acetone freddo per 10 min.

Per quanto riguarda l'esecuzione, le diluizioni a raddoppio del siero in esame venivano effettuate in PBS a partire da 1:40 (considerato da alcuni autori il titolo minimo per la leishmaniosi del cane). Queste venivano apposte sull'antigene ed incubate in termostato a 37°C per 30 min. In ogni test venivano utilizzati un siero di controllo positivo ed uno negativo per *Leishmania*. Dopo aver eseguito un lavaggio per 10' in PBS, sul vetrino veniva posto l'antisiero costituito da globuline di coniglio anti-IgG di cane coniugate con isotiocianato di fluoresceina (SIGMA), opportunamente titolate in precedenza. La diluizione generalmente usata, effettuata con PBS, era di 1:100 con aggiunta di Bleu di Evans (1:4000) come colorante di contrasto. Il vetrino veniva posto di nuovo in termostato a 37°C per 30 min. Dopo lavaggio in PBS per altri 10', sul vetrino venivano apposti una goccia di glicerolo-PBS ed un coprioggetto.

La lettura veniva effettuata su microscopio a fluorescenza Leitz con ingrandimento 300 x.

Per tutti gli studi, la diluizione cut-off da noi presa in considerazione come indicativa di infezione era quella di 1:160.

4.4.11 Analisi ematologiche

Quest'analisi è stata effettuata presso l'Università Di Napoli attraverso il protocollo in uso.

Il conteggio totale delle cellule del sangue è stato determinato con un apparato SEAC GENIUS S.

4.4.12 Analisi biochimiche

La determinazione delle PT ed il rapporto albumine/globuline sono state eseguite presso l'Università di Napoli secondo il protocollo descritto nell'articolo "Incidence and time course of *Leishmania Infantum* infections examined by

parasitological, serologic and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to 3 consecutive transmission seasons” di Oliva et al. Journal of clinical microbiology, 2006, p.1318-1322.

Il siero necessario per le indagini sierodagnostiche è stato ottenuto da sangue periferico prelevato con siringa da 10 ml da una vena brachiale o, nel caso di cani di piccola taglia, da una vena giugulare. Il campione, posto in una provetta da 10 ml, è stato lasciato coagulare e successivamente centrifugato a 1.500 rpm per 10 min. Il siero così ottenuto è stato raccolto e congelato a -40°C fino al momento del test.

4.4.13 Coltura dei parassiti

Quest'analisi è stata effettuata presso il laboratorio MIPI secondo il protocollo descritto nell'articolo “Incidence and time course of *Leishmania Infantum* infections examined by parasitological, serologic and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to 3 consecutive transmission seasons” di Oliva et al. Journal of clinical microbiology, 2006, p.1318-1322.

Il materiale prelevato da ogni puntura popliteale è stato messo in coltura nel terreno Evans a 22 gradi, le colture sono state esaminate per controllare la crescita dei promastigoti per un mese.

4.4.13.1 Terreno di coltura: Evans' modified Tobie's medium (EMTM) (Evans, 1987)

E' un ricco terreno bifasico costituito da una componente liquida e da una solida (agar-sangue) (Tabella xyz). E' noto essere un buon terreno per l'isolamento e il mantenimento di tutte le specie di *Leishmania* descritte nel mondo.

TERRENO EMTM

Fase liquida (pH 7,2)	g/L	Fase solida	g/L
KCl	0,4	Bacteriological peptone (Oxoid L37)	5
Na₂HPO₄ x 12 H₂O	0,06	Beef extract (Oxoid Lab-Lemco L29)	3
KH₂PO₄	0,06	NaCl	8
CaCl₂ x 2 H₂O	0,185	Agar (Oxoid purified)	20
MgSO₄ x 7 H₂O	0,1	Bacteriological peptone (Oxoid L37)	5
Mg Cl₂ x 6 H₂O	0,1	Beef extract (Oxoid Lab-Lemco L29)	3
NaCl	8	NaCl	8
L-Prolina	1	Agar (Oxoid purified)	20

Le due fasi, sterilizzate in autoclave a 121°C per 20 min, possono essere conservate a 4°C per più di un anno.

La fase solida viene completata con l'aggiunta del 15% di sangue ventricolare di coniglio, defibrinato meccanicamente mediante palline di vetro di 3-4 mm di diametro. In breve, l'agar arricchito di nutrienti viene sciolto e raffreddato ad una temperatura di circa 45°C; ad esso vengono aggiunti 15 ml di sangue di coniglio e il composto viene distribuito in tubi da batteriologia e in ampolline di plastica sterili da criogenia (NUNC) da 5 ml e lasciato raffreddare su piano inclinato in modo da assumere la forma di becco di clarino. I tubi e le ampolline contenenti EMTM agar-sangue possono essere mantenuti a 4°C per 15-20 giorni.

Le due fasi, agar-sangue e fase liquida, vengono mantenute separate a 4°C fino al momento dell'uso per evitare il degradamento del terreno e il distacco in soluzione dei globuli rossi. Al momento dell'uso la fase liquida viene completata con l'aggiunta di 5-10% di siero fetale bovino (Fetal Calf Serum, FCS) (HyClone), 250 mg/ml di Gentamicina (SIGMA) e 500 mg/ml di 5-Fluorocitosina (SIGMA). Appena pronta, questa soluzione finale viene distribuita in quantità di 1-1,5 ml per i tubi e 0,5 ml per le ampolline.

4.4.14 Estrazione del DNA

Il DNA veniva estratto da un singolo campione di midollo osseo o buffy-coat mediante il kit Easy-DNATM (Invitrogen, San Diego, CA, USA). A 350 µl di campione venivano aggiunti 500 µl di soluzione A, tampone di lisi provvisto dal kit, omogenati per qualche secondo e incubati a 65°C per 6 minuti. Alla sospensione venivano aggiunti 900 µl di cloroformio ed essa veniva accuratamente agitata, la precipitazione del DNA veniva ottenuta aggiungendo 200 µl di soluzione B, tampone di precipitazione, seguita da una centrifugazione a 13.000 rpm per 10 minuti.

La centrifugazione permetteva così la formazione di due fasi: a) il DNA in superficie, nella fase acquosa, mentre b) le proteine e i lipidi nell'interfaccia solida e il cloroformio nella parte inferiore.

Il DNA veniva rimosso, precipitato con etanolo e risospeso in TE-buffer. Il DNA purificato era così usato direttamente per la PCR²⁶¹ o mantenuto a 4°C per 1 o 2 giorni o a -20°C per tempo indeterminato.

4.4.14.1 PCR

La reazione di PCR utilizzata permette di identificare una sequenza ripetuta del SSU rRNA.²⁶²

Per la prima reazione di amplificazione è stata utilizzata la coppia di primers R221 (5'GGTTCCTTTCCTGATTACG3') e R332 (5'GGCCGGTA AAGGCCGAATAG5') il cui prodotto di amplificazione è di 603 bp.

La reazione veniva condotta in un volume finale di 50 µl contenente: a) 10 µl di DNA, b) 25 µl di Master Mix (Promega), c) 50 pmol di ciascun primer R221 e R332 e d) il resto del volume con acqua bidistillata.

Le condizioni di amplificazione dopo una denaturazione iniziale a 94°C per 5 min., erano le seguenti: a) denaturazione a 94°C per 75 sec., b) annealing a 60°C per 1 min., c) polimerizzazione a 72°C per 2 min.; per 32 cicli in termociclo automatico (Perkin Elmer).

Dieci µl dei prodotti di PCR venivano analizzati su gel di agarosio 1,5% con 0,5 µg/ml di etidio bromuro utilizzando un controllo negativo (senza “template”) e un controllo positivo (con DNA “template” di *Leishmania*).

4.4.14.2 Nested (n)-PCR

Quest'analisi è stata effettuata dal dipartimento mipi su campioni di dna midollari secondo il protocollo descritto dall'art di Oliva²⁶³ et al. 2006.

La PRC è un'amplificazione in due tempi.

Nella seconda reazione di PCR (n-PCR) sono stati usati i primers R223 (5'TCCCATCGCAACCTCGGTT3') e R333 (5'AAAGCGGGCGCGGTG CTG3') il cui prodotto di amplificazione è di 358 bp e risulta interno alla s²⁶⁴

Per la n-PCR, la reazione veniva condotta in un volume finale di 50 µl contenente: a) 3 µl del prodotto della prima PCR, b) 25 µl di Master Mix (Promega), c) 50 pmol di ciascun primer R223 e R333 e d) il resto del volume con acqua bidistillata.

Le condizioni di temperatura di amplificazione usate erano uguali a quelle sopra descritte.

Per ogni esperimento veniva fatto un controllo negativo (senza “template”) e un controllo positivo (con DNA “template” di *Leishmania*).

Dieci µl dei prodotti di n-PCR venivano analizzati su gel d'agarosio 1,5% con 0,5 µg/ml di etidio bromuro come sopra descritto.

4.4.14.3 Realtime PCR

Quest'analisi è stata eseguita presso i laboratori della ditta commissionatrice, su DNA estratto da un campione midollare. La quantificazione del DNA è stata realizzata usando il sistema “Applied Biosystem 7900”. Tale metodica è descritta nell'articolo “quantification of *Leishmania infantum* DNA by a RT-PCR assay with sensitivity”, Journal of clinical microbiology 2004, p5249-5255.

4.4.15 Eventi avversi

In qualunque caso di mortalità, malattia, o comportamento anomalo che sia o meno stato considerato legato al vaccino è stato condotto un esame completo del soggetto. I risultati sono stati registrati nella scheda n. 5.

A seconda della natura e dell'importanza dei sintomi è stato deciso di iniziare un trattamento autorizzato o di eseguire l'eutanasia dell'animale.

Prima dell'eutanasia sono stati effettuati prelievi ematici, midollari e linfonodali, successivamente seguiti da un esame necroscopico che ha permesso di accertare le cause dei sintomi.

Scheda 5

TATTOO :						GROUP :	
AE N°	Description of the Adverse Event (AE) (specify known or supposed etiology)	Starting date (dd/mm/yy)	Duration of Adverse Event (day)	S*	O*	Treatment	Paraph
1		... / ... / ...				<input type="checkbox"/> yes <input type="checkbox"/> no	
2		... / ... / ...				<input type="checkbox"/> yes <input type="checkbox"/> no	
3		... / ... / ...				<input type="checkbox"/> yes <input type="checkbox"/> no	
4		... / ... / ...				<input type="checkbox"/> yes <input type="checkbox"/> no	
5		... / ... / ...				<input type="checkbox"/> yes <input type="checkbox"/> no	

* [S]	Severity	1	Mild	2	Moderate	3	Severe	4	Life threatening		
* [O]	Outcome	1	Complete recovery	2	Recovery with sequelae	3	Ongoing	4	Worsening	5	Death

Treatments used to control the adverse event(s) (if necessary) :						
AE N°	Active ingredient	Registered name	Posology	Route of administration	Starting date (dd/mm/yy)	Duration of treatment (day)
					... / ... / ...	
					... / ... / ...	
					... / ... / ...	
					... / ... / ...	
					... / ... / ...	

I certify that the information presented here above is complete and exact,
 Dr (Paraph and date) : _____
 To send or fax after each new record to the monitor coordinator (Fax : +33 (0)4.92.08.71.99)

4.16 Xenodiagnosi

La xenodiagnosi è stata effettuata previa cattura di esemplari di *Phlebotomus Perniciosus*.

Nel corso dei mesi estivi, caratterizzati da elevate densità del vettore (giugno-agosto), è stato raccolto un numero sufficiente di femmine nutrite di sangue e/o gravide di *P. Perniciosus* mediante trappole CDC/CO₂ o catture manuali in diversi siti endemici del Centro Italia, allo scopo di allestire una colonia di laboratorio. La massiva produzione di femmine è stata fatta secondo metodiche standard (Maroli et al., J. Med. Entomol. 1987; 24/547-51).

4.16.1 .Protocollo xenodiagnosi

I cani (10 soggetti) sono stati sottoposti a xenodiagnosi secondo le metodiche descritte da Gradoni et al. (Med. Vet. Entomol. 1987; 1/339-42).

Previo sedazione il capo del soggetto è stato introdotto in un'apposta gabbia di tulle a maglia fine ed esposto alla puntura di circa 50 femmine di *p. Pernicius* di età compresa fra 4/5 gg. Dopo 60 minuti, tutte le femmine raccolte dalla gabbia sono state controllate con l'aiuto di un microscopio; le femmine che si sono nutrite sono state poi mantenute individualmente in boccette di vetro per la digestione del sangue ingerito; nel frattempo sono state nutrite con una soluzione satura di zucchero. Dopo 6/7 gg dal pasto di sangue, le femmine sono state dissezionate al microscopio ed esaminate per la presenza di promastigoti di leishmania nel canale intestinale. al grado d'infezione rilevato è stato attribuito un valore:

- -- nullo (no parassiti)= 0
- -- basso (1-100 parassiti)= 1
- -- moderato (100-500 parassiti)= 2
- -- elevato (500-1000 parassiti)= 3
- -- molto elevato (> di 1000 parassiti)= 4

4.17 Classificazione delle categorie d'infezione

Prima di descrivere i risultati emersi dallo studio, vengo descritte le quattro categorie valutate (Oliva et al. 2006) in relazione ai risultati ottenuti dalle analisi sierologiche e parassitologiche effettuate sui cani in oggetto:

- Infezione subpatente: positività variabile nel tempo della n-PCR del campione midollare, e/o bassa positività del titolo IFAT al di sotto del valore soglia (1:80); striscio midollare, ELISA-K39 e coltura linfonodale negativi;
- Infezione patente: costante positività della n-PCR del campione midollare; titolo IFAT elevato (1:160) costante o in aumento; coltura linfonodale costantemente positiva; ELISA-K39 positiva e/o striscio midollare positivo.
- Patente asintomatico: infetto patente nel quale la vista clinica, e/o le indagini ematologiche ed ematobiochimiche non mostravano alterazioni riferibili alla leishmaniosi canina.
- Patente sintomatico: cane con infezione patente nel quale siano riscontrabili almeno 3 segni clinici, ivi comprese eventuali alterazioni clinico – patologiche.

Le varie categorie d'infezione sono riassunte nella figura 16

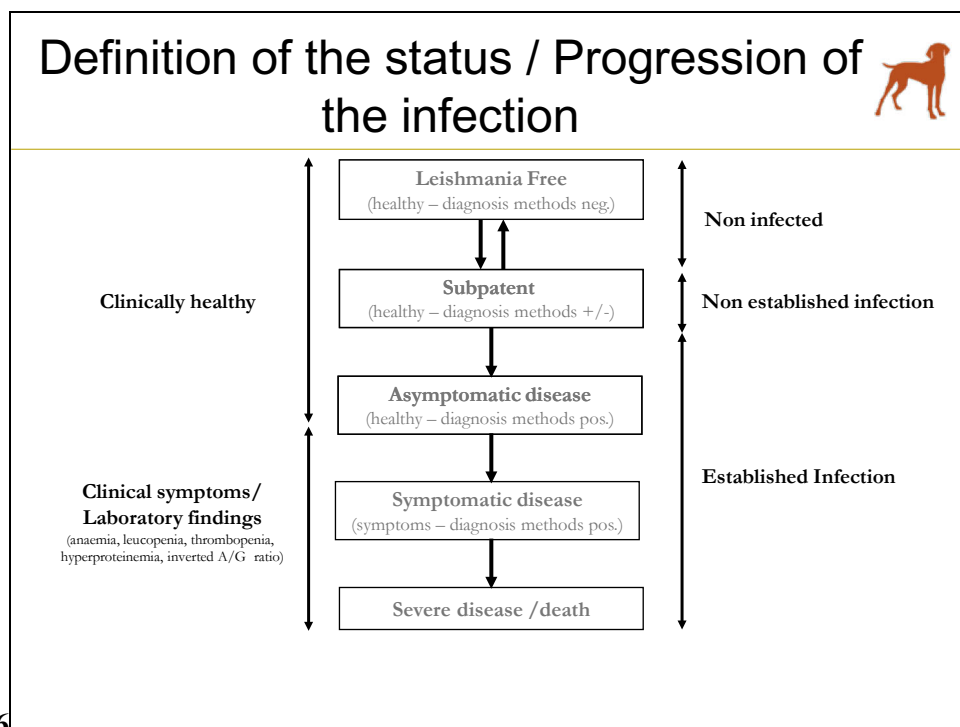


Figura 16

5 Risultati

I risultati sono riportati nella tabella n. 16 allegata.

Nell'appendice 1 sono riportati i risultati dei controlli effettuati, relativi ai soli soggetti positivi.

Tabella 16 - GRUPPO CONTROLLO

Soggetto	Tempo	n-PCR	RT-PCR (P/ml – log10)	EMTM	IFAT (1/X)	IFAT DVTP (1/X)	Hemato / bioch	Clinical signs	Conclusioni
1	M9	Neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
	M15	neg		neg	< 1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
	M18	neg		neg	1/40		Normale	Moderata perdita peso	Negativo
	M21	neg		neg	<1/40		PLT↓	Asintomatico	Negativo
	M24/M 25	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
	M30	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
	M33	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
2	M9	pos	6.5	pos	1/640	500	WBC↓ RBC↓ PLT↓	Mucose pallide	Patente sintomatico
	M15	pos	5.3	pos	20480	5000	WBC↓ RBC↓ PLT↓ rapporto A/G invertito TP ↑	Linfoadenopati a (pre- scapolari, poplitei e mandibolari)	Patente sintomatico
	M18	pos	6.6	pos	40960	5000	RBC↓ PLT↓ rapporto A/G invertito TP ↑	Atrofia muscolare perdita di peso Linfonodi prescapolari e poplitei aumentati	Patente Sintomatico
	M20	Alla necropsopia post-eutanasia si è rilevato: moderata epatomegalia, splenomegalia,							Soppresso

		linfadenpatia generalizzata e alterazione renale – Presenza di parassiti nella milza e fegato							
3	M9	neg		neg	<1/40		Normal	Lieve dimagrimento	Negativo
	M15	pos	4.9	pos	320	2000	PLT↓	Asintomatico	Patente asintomatico
	M18	pos	6.5	pos	5120	5000	RBC↓ PLT↓ rapporto A/G invertito	Linfonodi poplitei aumentati	Patente sintomatico
	M21	pos	6.7	pos	20480	5000	RBC↓ rapporto A/G invertito	Mucosa pallide Perdita di peso atrofia muscolare	Patente sintomatico
	M23	Alla necropsia dopo la morte naturale si è rilevato: moderata epatomegalia, con aree di necrosi, linfadenpatia generalizzata e nefrite							
4	M9	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
	M15	neg		neg	<1/40		PLT↓	Asintomatico	Negativo
	M18	neg		neg	1/40		Normal	Linf. Prescapolari aumentati	Negativo
	M21	neg		neg	<1/40		Normal	Splenomegalia	Negativo
	M24/M25	Pos (faint)		neg	<1/40		Normal	Asintomatico	Subpatente
	M30	neg		neg	<1/40		Normal	Asintomatico	Negativo
	M33	neg		neg	<1/40		Normal	Asintomatico	Negativo
5	M9	neg		neg	<1/40		PLT↓	Asintomatico	Negativo
	M15	neg		neg	<1/40		PLT↓	Asintomatico	Negativo
	M21	neg		neg	<1/40		Normal	Lieve perdita di peso	Negativo
	M24/M25	Pos (faint)		neg	<1/40		Normal	Asintomatico	Subpatente
	M30	neg		neg	<1/40		Normal	Asintomatico	Negativo

	M33	pos		neg	<1/40		Normal	Asintomatico	Subpatente
6	M9	pos	3.3	pos	<1/40	(-)	PLT↓	Asintomatico	Patente asintomatico
	M15	pos	5.6	pos	5120	2000	RBC↓ PLT↓ rapporto A/G invertito	Seborrea secca Atrofia muscolare Perdita di peso Linfonodi pescapolari aumentati	Patente sintomatico
	M18	pos	6.5	pos	20480	12500	RBC↓ PLT↓ rapporto A/G invertito	Perdita di peso atrofia muscolare Linfonodi prescapolari e poplitei aumentati	Patente sintomatico
	M20	Alla necropsopia post-eutanasia si è rilevato: moderata epatomegalia, splenomegalia, linfadenopatia generalizzata e alterazioni renali – Presenza di parassiti nella milza e fegato							Deceduto
7	M9	neg		neg	<1/40		RBC↓	asintomatico	negativo
	M15	pos	3.8	pos	160	(-)	RBC↓	asintomatico	Patente asintomatico
	M18	pos	6.2	pos	1280	2000	PLT↓	asintomatico	Patente asintomatico
	M21	pos	6.6	pos	20480	5000	PLT↓ rapporto A/G invertito	Perdita di peso linfadenopatia (pre-scapolari) Splenomegalia	Patente sintomatico
	M24/M25	pos	6.3/6.4	pos	10240	5000	RBC↓ PLT↓ WBC↓ Rapporto A/G invertito	perdita di peso linfadenopatia (poplitei)	Patente sintomatico

						TP ↑		
--	--	--	--	--	--	------	--	--

CONTROLLO (Continuo)

Soggetto	Tempo	n-PCR	RT-PCR (P/ml - log10)	EMTM	IFAT (1/X)	IFAT DVTP (1/X)	Emato / bioch	Segni clinici	Conclusioni
8	M9	neg		neg	<1/40		RBC↓ TP↓	Severa perdita di peso Alopecia lieve Mucose pallide	Negativo
	M15	pos	1.7	(neg	<1/40	(-)	PLT↓	Asintomatico	Subpatente
	M18	pos	6.0	pos	320	(-)	PLT↓	Asintomatico	Patente asintomatico
	M21	pos	6.6	pos	10240	5000	PLT↓ rapporto A/G invertito	Asintomatico	Patente asintomatico
	M24/M25	pos	6/5.5	pos	10240	5000	RBC↓ PLT↓ rapporto A/G invertito TP ↑	Paracheratosi nasale Linfonodi popliyei e prescapolai aumentati Perdita di peso media	Patente sintomatico
	M30	pos		pos	1/5120		PLT↓ rapporto A/G invertito TP ↑	Ulcere/noduli, Linfonodi prescapolari aumentati	Patente sintomatico
	M33	pos		pos	1/2560		RBC↓ PLT↓ rapporto A/G invertito	prescapolari ingrossati, scarse condizioni generali, atrofia muscolare	Patente sintomatico

							TP ↑		
9	M9 + M15	neg		neg	<1/40		TP↓	Asintomatico	negativo
	M18	pos	4.7	pos	<1/40	(-)	WBC↑ PLT↓	Asintomatico	Patente asintomatico
	M21	pos	6.7	pos	5120	1000	WBC↑ PLT↓ rapporto A/G invertito	Asintomatico	Patente sintomatico
	M24/M25	pos	5.8/6.2	pos	10240	5000	TP ↑ PLT↓ rapporto A/G invertito	Linfoadenopatia (poplitei)	Patente sintomatico
10	M9 + M15	neg		neg	<1/40		RBC↓	Asintomatico	Negativo
	M18	pos	2.3	neg	<1/40	(-)	RBC↓	Asintomatico	Subpatente
	M21	pos	4.7	pos	1/640	(-)	RBC↓ rapporto A/G invertito	Linfonodi prescapolari e poplitei aumentati	Patente sintomatico
	M24/M25	pos	6.7/6.6	pos	1/5120	2000	RBC↓WBC↓ PLT↓ rapporto A/G invertito	Splenomegalia	Patente sintomatico
	M 30	pos		pos	1/2560		RBC↓PLT↓ rapporto A/G invertito	Linfonodi prescapolari e poplitei aumentati	Patente sintomatico

						TP ↑		
	M 33	pos		pos	1/5120	RBC↓PLT↓ rapporto A/G invertito TP ↑	Onicogrifosi, Linfonodi prescapolari e poplitei aumentati Condizioni generali scarse Atrofia muscolare	Patente sintomatico
11	M9	neg		neg	<1/40	Normale	Linfonodi prescapolari aumentati	Negativo
	M15	neg		neg	<1/40	Normale	Asintomatico	Negativo
	M18	neg		neg	<1/40	Normal	Asintomatico	Negativo
	M21	neg		neg	<1/40	Normal	Asintomatico	Negativo
	M24/M25	Pos (faint)		neg	< 1/40	Normale	Asintomatico	Subpatente
	M30	neg		neg	<1/40	Normal	Asintomatico	Negativo
	M33	neg		neg	<1/40	RBC↓	Condizioni generali scarse	Negativo
12	M9	neg		neg	<1/40	Normal	Asintomatico	Negativo
13	M9	neg		neg	<1/40	RBC↓ PLT↓	Asintomatico	Negativo
	M15	neg		neg	<1/40	PLT↓	Asintomatico	Negativo
	M18	neg		neg	<1/40	RBC↓	Asintomatico	Negativo
	M21	neg		neg	<1/40	RBC↓ PLT↓ TP↓	Asintomatico	Negativo
	M24/M25	pos		neg	1/80	RBC↓	Asintomatico	Subpatente
14	M9	neg		neg	<1/40	Normal	Lieve perdita di peso e poplitei ingrossati	Negativo
	M15	neg		neg	<1/40	Normal	Asintomatico	Negativo

	M18	neg		neg	<1/40		RBC↓	Linfonodi poplitei aumentati	Negativo
	M21	neg		neg	<1/40		Normal	Asintomatico	Negativo
	M24/M25	neg		neg	<1/40		RBC↓	Asintomatico	Negativo
	M30	neg		neg	<1/40		RBC↓	Asintomatico	Negativo
	M33	neg		neg	<1/40		Normale	Condizioni generali scarse	Negativo
15	M9	neg		neg	<1/40		Normale	Linfonodi prescapolari e poplitei aumentati	Negativo
	M15	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
	M18	neg		neg	<1/40		Normale	Prescapolari ingrossati	Negativo
	M21	neg		neg	1/40		TP↓	Asintomatico	Negativo
	M24/M25	Pos (faint)		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	Subpatente
	M30	neg		neg	<1/40		Normale	Condizioni generali scarse	Negativo
	M33	neg		neg	<1/40		TP↓	Condizioni generali scarse	Negativo
16	M9	pos	3.4	neg	<1/40	(-)	Normale	Asintomatico	Subpatente
	M15	neg		neg	<1/40	(-)	Normale	Asintomatico	Negativo
	M18	neg		neg	1/40	(-)	Normale	Linfonodi poplitei aumentati	Negativo
	M21	neg		neg	<1/40	(-)	Normale	Lieve dimagrimento Congiuntivite	Negativo
	M24/M25	neg	1.6/0	neg	1/40	(-)	Normale	Asintomatico	Negativo
	M30	neg		neg	<1/40		Normale	Congiuntivite	Negativo
	M33	neg		neg	<1/40		RBC↓	Condizioni generali scarse	Negativo

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

CONTROLLO (continuo)

Soggetto	Tempo	n-PCR	RT-PCR (P/ml – log10)	EMT M	IFAT (1/X)	IFAT DVTP (1/X)	Hemato / bioch	Segni clinici	Conclusioni
17	M 9	neg		neg	<1/40		Normale	Ulcere e noduli	Negativo
	M15	Pos (faint)		neg	<1/40	(-)	PLT↓	Asintomatico	Subpatente
	M18	Pos (Faint)		neg	<1/40	(-)	PLT↓	Asintomatico	Subpatent infection
	M21	neg		neg	<1/40	(-)	PLT↓	Asintomatico	Negativo
	M24/M25	Pos (Faint)	0/0	neg	<1/40	(-)/ND	Normale	Asintomatico	Subpatent infection
	M 30	neg		neg	1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
	M 33	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
18	M 9	neg		neg	<1/40		PLT↓	Asintomatico	Negativo
	M 15	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
	M 18	neg		neg	<1/40		Normale	Splenomegalia	Negativo
	M21	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
	M24/M25	Pos (Faint)		neg	<1/40	(-)/ND	RBC↓	Splenomegalia	Subpatente
	M 30	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
	M 33	neg		neg	1/40		RBC↓	Asintomatico	Negativo
19	M 9	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
	M 15	neg		neg	<1/40		PLT ↓	Asintomatico	Negativo
	M 18	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
	M21	neg		neg	1/80	(-)	Normale	Asintomatico	Negativo
	M24/M25	Pos		neg	1/40	(-)/ND	Normale	Asintomatico	Subpatente

		(Faint)							
	M 30	pos		pos	<1/40		Normale	Asintomatico	Patente asintomatico
	M 33	pos		pos	1/80		Normale	Asintomatico	Patente asintomatico
20	M 9	neg		neg	<1/40		PLT ↓	Asintomatico	Negativo
	M 15	neg		neg	<1/40		PLT ↓	Onicogrifosi	Negativo
	M18	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
	M21	neg		neg	<1/40		PLT ↓	Asintomatico	Negativo
	M24/M25	Pos (Faint)		neg	<1/40	(-)/ND	Normale	Onicogrifosi	Subpatente
	M 30	neg		neg	1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
	M 33	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	Negativo

- GRUPPO VACCINATI

Tattoo	Time	n-PCR	RT-PCR (P/ml – log10)	EMTM	IFAT (1/X)	IFAT DVTP (1/X)	Hemato / bioch	Clinical signs	Conclusioni
21	M9	pos	4.3	pos	1/80	500	PLT↓ TP ↑	Asintomatico	Patente asintomatico
	M15	pos	6.9	pos	1/320	5000	RBC↓ PLT↓ TP ↑ rapporto A/G invertito	Linfonodi prescapolari e poplitei aumentati	Patente sintomatico
	M18	pos	7.0	pos	1/1280	12500	RBC↓ PLT↓ TP ↑ rapporto A/G invertito	Linfonodi prescapolari e poplitei aumentati)	Patente sintomatico
	M21	pos	6.9	pos	1/40960	5000	RBC↓ PLT↓ TP ↑ rapporto A/G invertito	Atrofia muscolare Dimagrimento Linfonodi prescapolari e poplitei aumentati popliteal) Splenomegalia	Patente sintomatico
	M24/M25	Pos	6.3/NT	pos	1/20480	12500	RBC↓ PLT↓ TP ↑ rapporto A/G invertito	Atrofia muscolare Dimagrimento Linfonodi prescapolari e poplitei aumentati popliteal) Splenomegali)	Patente sintomatico Soppresso
Necropsia post-eutanasia : lesion dermatologiche diffuse, epatomegalia, splenomegalia, linfadenopatia generalizzata, alterazioni renali e presenza di amastigoti in molte cellule									
22	M 9	neg		neg	<1/40		PLT↓	Asintomatico	Negativo
	M 15	neg		neg	1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
	M18	pos	2.8	pos	1/160	(-)	WBC↑	Asintomatico	Patente asintomatico
	M21	pos	3.8	pos	1/640	200	Normale	Asintomatico	Patente asintomatico

	M24/M25	pos	6.1/4.1	pos	1/2560	1000	PLT↓	Asintomatico	Patente asintomatico
	M 30	pos		pos	1/5120		RBC↓ PLT↓ TP ↑ Inverted A/G ratio	Linfonodi poplitei aumentati	Patente sintomatico
	M 33	pos		pos	1/2560		Inverted A/G ratio	poor body condition, muscle atrophy	Patente sintomatico

VACCINATI (continuo)

23	M 9	neg		neg	<1/40		PLT↓	asymptomatic	Negativo
	M 15	neg		neg	<1/40		PLT↓	asymptomatic	Negativo
	M 18	neg		neg	1/40		Normale	Lieve dimagrimento Linfododi prescapolari aumentati	Negativo
24	M 9	neg		neg	<1/40		RBC↓ TP ↓	Pallore delle mucose	Negativo
	M 15	neg		neg	1/40		RBC↓ PLT↓	Asintomatico	Negativo
	M18	neg		neg	1/80		RBC↓	Asintomatico	Negativo
	M 21	neg		neg	1/160		RBC↓ PLT↓ TP ↓	Lieve dimagrimento	Negativo
	M24/ M25	neg		neg	1/160		RBC↓	Asintomatico	Negativo
	M 30	neg		neg	1/80		RBC↓ WBC↑ TP ↓	Scarse condizioni generali Pallore delle mucose	Negativo
25	M 9	neg		neg	<1/40		PLT↓	Asintomatico	Negativo
	M 15	neg		neg	1/40		PLT↓	Asintomatico	Negativo
	M 18	neg		neg	1/160		Normale	Asintomatico	Negativo
	M 21	neg		neg	1/160		TP ↓	Asintomatico	Negativo

	M24/M25	neg		neg	1/320		Normale	Asintomatico	Negativo
	M 30	neg		pos	1/160		Normale	Asintomatico	Negativo
	M 33	pos		pos	1/160		RBC↓ PLT↓	Asintomatico	Patente asintomatico
26	M 9	neg		neg	<1/40		PLT↓	Asintomatico	Negativo
	M 15	neg		neg	1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
	M18	neg		neg	1/80		Normale	Asintomatico	Negativo
	M21	neg		neg	1/160		Normale	Asintomatico	Negativo
	M24/M25	neg		neg	1/640		Normale	Asintomatico	Negativo
	M30	neg		neg	1/80		Normale	Asintomatico	Negativo
	M33	neg		neg	1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
27	M9	neg		neg	<1/40		RBC↓ PLT↓	Asintomatico	Negativo
	M15	neg		neg	<1/40		PLT↓	Asintomatico	Negativo
	M18	neg		neg	1/40		PLT↓	Asintomatico	Negativo
	M21	neg		neg	1/160		PLT↓	Asintomatico	Negativo
	M24/M25	neg		neg	1/640		Normale	Asintomatico	Negativo
	M30	neg		neg	1/80		Normale	Asintomatico	Negativo
	M33	neg		neg	<1/40		RBC↓ PLT↓	Asintomatico	Negativo
28	M9	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
	M15	neg		neg	1/40		RBC↓ PLT↓	Asintomatico	Negativo
	M18	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
	M21	neg		neg	1/80		TP↓	Asintomatico	Negativo
	M24/M25	neg		neg	1/320		Normale	Asintomatico	Negativo
	M30	pos		neg	1/80		Normale	Asintomatico	Subpatente
	M33	pos		pos	1/320		PLT↓	Asintomatico	Patente asintomatico
29	M9	neg		neg	<1/40		PLT↓	Asintomatico	Negativo
	M15	neg		neg	1/40		TP↓	Linfonodi poplitei aumentati	Negativo
	M18	neg		neg	1/80		WBC↑	Asintomatico	Negativo

	M21	neg		neg	1/80		TP↓	Asintomatico	Negativo
	M24/M25	neg		neg	1/640		RBC↓ TP↓	Asintomatico	Negativo
	M30	neg		neg	1/80		PLT↓	Scarse condizioni corporee	Negativo
	M 33	neg		neg	<1/40		TP↓	Scarse condizioni corporee	Negativo
30	M9	neg		neg	<1/40		PLT↓	Asintomatico	Negativo
	M15	neg		neg	1/40		RBC↓	Asintomatico	Negativo
	M18	neg		neg	<1/40		RBC↓	Lieve dimagrimento	Negativo
	M21	neg		neg	1/40		RBC↓	Asintomatico	Negativo
	M24/M25	neg		neg	1/320		PLT↓	Asintomatico	Negativo
	M30	neg		neg	1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
	M33	neg		neg	<1/40		RBC↓ TP↓	Asintomatico	Negativo
31	M9	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
	M15	neg		neg	1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
	M18	neg		neg	< 1/40		RBC↓ TP↓	Lieve dimagrimento Linfonodi poplitei aumentati	Negativo
	M21	neg		neg	1/80		Normale	mild alopecia	Negativo
	M24/M25	neg		neg	1/640		Normale	Asintomatico	Negativo
	M30	neg		neg	1/40		PLT↓	Asintomatico	Negativo
	M33	neg		neg	1/40		RBC↓	Asintomatico	Negativo
32	M9	pos		pos	<1/40		RBC↓ TP↓ PLT↓	Asintomatico	Patente asintomatico
	M15	Pos (faint)		pos	1/40		TP↓ PLT↓	Asintomatico	Patente asintomatico
33	M9	neg		neg	1/40		TP↓	Blefarite	Negativo
	M15	neg		neg	1/40		TP↓	Asintomatico	Negativo
	M18	neg		neg	1/80		Normale	Asintomatico	Negativo
	M21	neg		neg	1/40		WBC↑	Asintomatico	Negativo
	M24/M25	neg		neg	1/320		RBC↓ TP↓	Asintomatico	Negativo
	M30	neg		neg	1/320		Normale	Asintomatico	Negativo
	M33	neg		neg	1/80		Normale	Asintomatico	Negativo

34	M9	neg		neg	<1/40		Normale	Linfonodi prescapolari aumentati	Negativo
	M15	Pos (faint)		neg	1/40	(-)	PLT↓	asintomatico	Subpatente
	M18	neg		neg	1/80	(-)	Normale	asintomatico	Negativo
	M21	Pos(Faint)		neg	1/80	(-)	Normale	Lieve dimagrimento Alopecia tarso sinistro Depigmentazione del naso	Subpatente
	M24/M25	neg	(-)/(-)	neg	1/320	500/ND	Normale	Asintomatico	Negativo
	M30	neg		neg	1/80		Normale	Asintomatico	Negativo

35	M9	neg		neg	<1/40		PLT↓	Linfonodi prescapolari aumentati	Negativo
	M15	Pos(Faint)		neg	1/40	(-)	TP↓	Asintomatico	Subpatente
	M18	neg		neg	<1/40		WBC↑	Asintomatico	Negativo
	M21	neg		neg	1/40		RBC↓ TP↓	Asintomatico	Negativo
	M24/M25	Pos (Faint)	2.9/(-)	neg	1/640	200/ND	Normale	Asintomatico	Subpatente
	M 30	neg		neg	1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
	M33	neg		neg	<1/40		RBC↓ TP↓	Asintomatico	Negativo
36	M9	Pos (faint)		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	Subpatente
	M15	Pos (faint)		neg	1/40	(-)	Normale	Asintomatico	Subpatente
	M18	neg		neg	1/40	(-)	Normale	Asintomatico	Negativo
	M21	neg		neg	1/80	(-)	Normale	Asintomatico	Negativo
	M24/M25	Pos (Faint)	3.1/(-)	neg	1/640	500/ND	Normale	Asintomatico	Subpatente
	M 30	neg		neg	1/80		Normale	popliteal enlarged	Negativo
	M 33	pos		pos	1/40		RBC↓	Asintomatico	Patente asintomatico
37	M9	Pos (Faint)		neg	<1/40	(-)	Normale	Asintomatico	Subpatente
	M15	Pos (Faint)		neg	1/40	(-)	Normale	Asintomatico	Subpatente
	M18	neg		neg	<1/40	(-)	Normale	Asintomatico	Negativo
	M21	neg		neg	1/40	(-)	Normale	Asintomatico	Negativo
	M24/M25	Pos (Faint)	2.4/(-)	neg	1/320	(-)/ND	Normale	Asintomatico	Subpatente
	M30	neg		neg	1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
	M33	pos		neg	<1/40		TP↓	Asintomatico	Subpatente
38	M9	Pos (Faint)		neg	<1/40	(-)	RBC↓	Asintomatico	Subpatente
	M15	neg		neg	1/40	(-)	PLT↓	Asintomatico	Negativo
	M18	neg		neg	<1/40	(-)	PLT↓	Asintomatico	Negativo
	M21	neg		neg	1/40	(-)	PLT↓	Asintomatico	Negativo
	M24	Diagnosi dopo morte naturale: enterite catarrale-emorragica e pneumopatia lobulare							Deceduto

VACCINATI (continuo)

Tattoo	Time	n-PCR	RT-PCR (P/ml – log10)	EMTM	IFAT (1/X)	IFAT DVTP (1/X)	Hemato / bioch	Clinical signs	CONCLUSION
39	M9	neg		neg	<1/40		PLT↓	Lieve dimagrimento	Negativo
	M15	neg		neg	1/80		PLT↓	Lieve dimagrimento	Negativo
	M18	neg		neg	1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
	M21	neg		neg	1/40		Normale	Ulcere e noduli	Negativo
	M24/M25	Pos (Faint)	3.2/(-) 7	(-)/ND	1/320	500/ND	Normale	Asintomatico	Subpatente
	M30	neg		neg	1/40		Normale		Negativo
40	M9	neg		neg	<1/40		PLT↓	Asintomatico	Negativo
	M15	neg		neg	1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
	M18	neg		neg	1/160		Normale	Asintomatico	Negativo
	M21	neg		neg	1/160		Normale	Asintomatico	Negativo
	M24/M25	Pos (Faint)	(-)/(-)	neg	1/320	500/ND	Normale	Asintomatico	Subpatente
	M30	neg		neg	1/80		Normale	ulcers/nodules	Negativo
	M33	neg		neg	1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
41	M9	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
	M15	neg		neg	1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
	M18	neg		neg	1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
	M21	neg		neg	1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
	M24/M25	Pos (faint)	1.6/(-)	neg	1/640	200/ND	Normale	Asintomatico	Subpatente
	M30	neg		neg	1/80		Normale	Asintomatico	Negativo
	M33	neg		neg	1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
	M9	neg		neg	<1/40		Normale	Asintomatico	Negativo
	M15	neg		neg	1/40		PLT↓	Asintomatico	Negativo
	M18	neg		neg	1/80		Normale	Asintomatico	Negativo

42	M21	neg		neg	1/80		Normale	Asintomatico	Negativo
	M24/M25	Pos (faint)	3.2/(-)	neg	1/320	1000/ND	Normale	Asintomatico	Subpatente
	M30	pos		pos	1/160		Normale	Asintomatico	Patente sintomatico
	M33	pos		pos	1/640		RBC↓ PLT↓ TP↓	poor body condition	Patente sintomatico
43	M 9	neg		neg	<1/40		RBC↓ PLT↓	Asintomatico	Negativo
	M15	neg		neg	1/80		RBC↓	Asintomatico	Negativo
	M18	neg		neg	1/160		RBC↓	Asintomatico	Negativo
	M21	neg		neg	1/160	500	RBC↓	Asintomatico	Negativo
	M24/M25	pos (faint)	2.2/(-)	neg	1/320	200/ND	PLT↓	Asintomatico	Subpatente
	M30	neg		neg	1/80		Normale	Asintomatico	Negativo
	M33	neg		neg	1/40		RBC↓	Asintomatico	Negativo

I risultati principali ottenuti nello studio possono essere così riassunti:

nel corso dello studio, 32/43 cani (74,42%) hanno sviluppato un'infezione subpatente; 15/43 (34,88%) hanno sviluppato un'infezione patente (il 46,87% di quelli che avevano contratto un'infezione sub patente) e 10/43 (23,26%) cani hanno sviluppato segni clinici riportabili a leishmaniosi canina. Tre cani del gruppo controllo sono deceduti in seguito alla malattia; nel gruppo dei vaccinati, invece, solo 1 cane è deceduto per cause riportabili alla malattia.

Nello specifico, la dimostrazione dell'avvenuta infezione (dimostrazione del parassita esclusivamente mediante tecnica PCR,) del suo definitivo attecchimento (dimostrazione del parassita vivo e vitale in coltura), e della comparsa di alterazioni cliniche e/o clinico-patologiche è avvenuta con la tempistica di seguito riportata:

Dog	Control group		
	Subpatent	Patent asymptomatic	Patent symptomatic
2	M9	M9	M9
3	M15	M15	M18
4	M24		
5	M24		
6	M9	M9	M15
7	M12	M15	M21
8	M15	M18	M24
9	M18	M18	M21
10	M18	M21	M21
11	M24		
13	M24		
15	M24		
16	M9		
17	M15		
18	M24		
19	M24	M 30	
20	M24		
	Average from exposure to first infection 18.3 months	Average from first infection to asymptomatic patent condition 1.9 months	Average from asymptomatic patent condition to disease 3.4 months

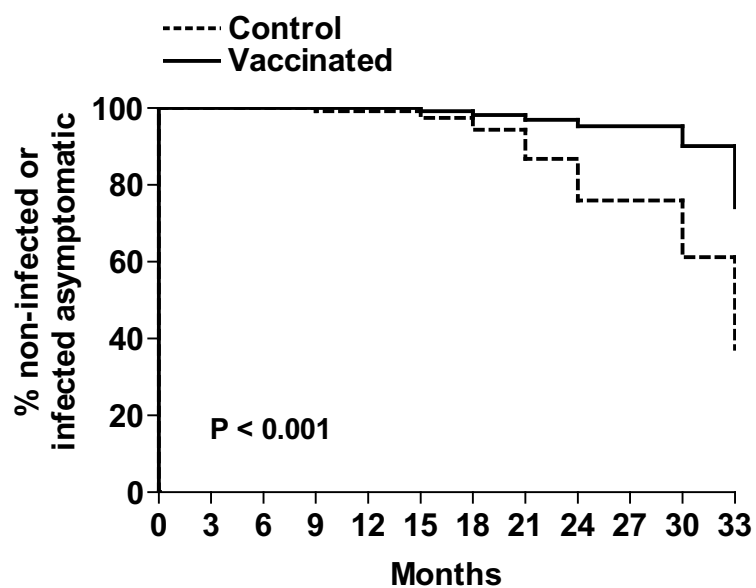
Dog	Vaccine group		
	Subpatent	Patent asymptomatic	Patent symptomatic
21	M9	M9	M15
22	M18	M18	M30
25	M30	M30	
28	M30	M33	
32	M9	M9	
34	M15		
35	M15		
36	M9	M33	
37	M9		
38	M9		
39	M24		
40	M24		
41	M24		
42	M24	M30	M33
43	M24		
	Average from exposure to first infection: 18.2 months (no difference)	Average from first infection to asymptomatic patent condition: 4.7 months (2.8 months delayed)	Average from asymptomatic patent condition to disease: 7 months (3.6 months delayed)

In particolare, 17 cani nel gruppo controllo hanno sviluppato un'infezione subpatente, evoluta in 8 casi in un'infezione chiaramente manifesta (patente). Nel gruppo dei vaccinati, 15 cani hanno avuto un'infezione subpatente che in 7 cani è evoluta in patente. Per quanto attiene allo sviluppo di segni clinici, 7/20 (35%) cani del gruppo controllo hanno mostrato segni di malattia, al contrario di quelli vaccinati nei quali solo in 3 (13,04%) soggetti è stato possibile evidenziare sintomatologia specifica ($p = .$ La rappresentazione della comparsa e progressione della malattia nel tempo è stata visualizzata con curva di Kaplan Meier (fig. 17) nella quale l'evento malattia è stato considerato come endpoint. Nelle curva si evidenzia una differenza statisticamente significativa ($p < 0.001$) tra il gruppo controllo ed il gruppo vaccinati.

Il tempo medio di comparsa dei segni clinici a partire dalla condizione di paziente asintomatico è stato di circa 3 mesi e mezzo nel gruppo controllo e 7

mesi nel gruppo dei cani vaccinati. I segni clinici registrati e le alterazioni ematologiche ed ematobiochimiche non si sono discostati da quelli ampiamente descritti in letteratura.

Figura 17



5.1 Risultati xenodiagnosi

Sono stati valutati due parametri comparati fra i gruppi mediante analisi multivariata:

- tasso medio dei flebotomi infetti (n. infetti/n. Nutriti);
- grado medio dell'intensità dell'infezione (da 0 a 4).

Dog ID	(n. of sand flies)	Positive/Dissected	Score/sand fly gut [0=no parasites; 1=less than 100p; 2=100-500p; 3=500-1000p; 4=more than 1000p]					
	Fed/Caged		0	1	2	3	4	Mean
10	32/60	25/31 (80.7%)	6	7	4	7	7	2.06
8	9/120	5/9 (55.5%)	4	1	4			1.00
22	26/60	9/20 (45.0%)	11	6	1	1	1	0.75
42	19/120	1/19 (5.3%)	18			1		0.16
37	27/60	1/23 (4.3%)	22	1				0.04
5	32/60	0/26	26					0.00
19	9/120	0/9	9					0.00
36	12/120	0/8	8					0.00
28	7/60	0/7	7					0.00
25	28/60	0/28	28					0.00
Total**	201/840 (24%)	41/180 (23%)	139	15	9	9	8	0.51

* Xenodiagnosis performed in 2 different dates

** Infectious burden of the selected canine pool

Dei 10 soggetti utilizzati per la metodica 4 appartenevano alla categoria patenti sintomatici, 4 alla patenti asintomatici e 2 a quella dei subpatenti.

Dei 79 pasti effettuati sui 4 soggetti patenti sintomatici 39 flebotomi sono risultati negativi alla dissezione mentre 40 sono risultati positivi, di questi ultimi, in base alla carica parassitaria analizzata, 14 con un basso grado d'infezione, 9 con un moderato grado, 9 con un elevato grado e 8 con un grado molto elevato d'infezione.

Dei 52 pasti compiuti sui soggetti patenti asintomatici nessun flebotomo è risultato positivo all'infezione.

Dei 49 pasti compiuti sui soggetti sub patenti un solo flebotomo è risultato positivo alla dissezione con un moderato grado d'infezione.

Dei 180 pasti totali realizzati sui 10 cani infetti, quindi, solo il 23% (41 esemplari) dei flebotomi è rivelato positivo.

Di seguito, invece, viene riportata la tabella con i risultati della prova, quando si confrontino cani vaccinati e non, paragonandoli in base alla condizione clinica.

Risultati della prova xeno diagnostica confrontando cani asintomatici contro cani sintomatici.

Clinical condition	Control dogs	Vaccinated dogs
Asymptomatic	0/35 (0%) Mean score: 0	1/66 (1.5%) Mean score: 0.01
Symptomatic	30/40 (75%) (*) Mean score: 1.82 (**)	10/39 (25.6%) (*) Mean score: 0.46 (**)

(*) Chi square for proportions: $P < 0.0001$

(**) Mann-Whitney test: $P < 0.0001$

6 Discussione

Per dare al lettore una più completa possibilità di analisi dei dati ottenuti, si ritiene utile, in fase di discussione, riportare le considerazioni che emergono dallo studio nella sua completezza e non soltanto quelle derivanti dai dati specifici presi in considerazione nella presente tesi. Questa parte, pertanto, è del tutto sovrapponibile a quella descritta nella tesi della Dr.ssa Rosa Paparcone.

I dati ottenuti permettono di fare alcune considerazioni che, per quanto descritto in premessa non possono essere ritenute definitive, in particolare per quanto riguarda la valutazione dell'efficacia del prodotto vaccinale.

Lo studio ha confermato la necessità di tempi particolarmente lunghi per seguire il decorso naturale dell'infezione leishmanica, soprattutto quando si voglia considerare lo sviluppo di malattia e non soltanto l'avvenuta infezione. Un dato particolarmente indicativo appare essere la perfetta sovrapposizione (18 mesi circa) nella dimostrazione dell'avvenuta infezione tra il gruppo controllo ed il gruppo dei cani vaccinati. In altri termini, il vaccino non è in grado di impedire che il parassita sia dimostrabile nell'organismo; tale evidenza sembra indicare che il vaccino non è completamente in grado di stimolare le difese immunitarie locali per distruggere il parassita al momento della sua deposizione nel derma. Questo dato, tuttavia, meritevole di studi molto più specifici ed approfonditi, non deve essere considerato come sicuramente negativo, in quanto la presenza del parassita, quando non associata a disseminazione sistemica dello stesso, potrebbe risultare uno stimolo necessario per attivare la memoria immunitaria. D'altra parte, uno studio clinico in Fase III deve necessariamente prevedere, per la sua riuscita, la scelta di un focolaio d'infezione ad elevata endemia che renda ben dimostrabile la differenza di risultati tra il gruppo controllo ed il gruppo dei vaccinati. da questo punto di vista, la scelta di una zona dell'area vesuviana, già nota per le sue caratteristiche epidemiologiche, si è rivelata senz'altro felice, come dimostrato dall'elevatissima incidenza d'infezione che è stata del 74,42%. Le tecniche utilizzate, in buona parte derivanti da un protocollo già adottato in

precedenza (Oliva et al., 2006) hanno permesso di seguire in maniera ottimale l'evoluzione dell'infezione. In particolare è stata confermata l'elevatissima sensibilità e precocità della n-PCR midollare, che ha permesso nel nostro caso la dimostrazione precoce dell'avvenuto contatto tra il parassita ed il cane. Anche in questo studio, tuttavia, analogamente a quanto già descritto (Oliva et al., 2006), la n-PCR midollare non può essere considerata la prova definitiva dell'avvenuta infezione, la quale è dimostrabile in maniera definitiva solo attraverso la dimostrazione in coltura del parassita. L'attecchimento dell'infezione è inevitabilmente seguito o accompagnato dalla dimostrazione di titoli anticorpali uguali o superiori al cut off considerato e progressivamente crescenti nel tempo. Anche la quantificazione della carica parassitaria, ottenuta mediante tecnica RT-PCR non ha consentito di prevedere con anticipo l'evoluzione dell'infezione. L'analisi dei dati, infatti, ha dimostrato che, con la tecnica utilizzata nel presente studio, la carica parassitaria è chiaramente dimostrabile come significativa e crescente nel tempo in maniera direttamente proporzionale alla positività colturale e alla dimostrazione di titoli anticorpali chiaramente indicativi d'infezione.

Per quanto attiene alla possibilità che il vaccino blocchi il definitivo stabilirsi dell'infezione, sembra evidenziarsi, con le cautele dovute alla parzialità dei dati in nostro possesso che vi sia un trend significativamente diverso tra il gruppo controllo ed il gruppo dei vaccinati che lascia ritenere che il vaccino quanto meno rallenti in maniera significativa lo stabilirsi dell'infezione. Tale differenza emerge in maniera ancora più chiara quando si consideri la progressione dell'infezione verso lo stato di malattia. In definitiva, pertanto, il prodotto testato sembra assicurare una discreta protezione nei confronti dello stabilirsi dell'infezione ed una buona protezione dallo sviluppo della malattia.

La valutazione dei risultati della prova xenobiotica, infine, pur eseguita su un numero non elevato di cani e quindi da confermare in un campione più ampio, sembra dimostrare che anche i cani vaccinati, quando chiaramente malati,

possono costituire un serbatoio attivo del parassita. E' indubbio, comunque, che la capacità media infettante dei vaccinati è significativamente più modesta rispetto ai cani del gruppo controllo. I dati ottenuti, inoltre, sembrerebbero dimostrare che la capacità infettante dei soggetti infetti ma non malati, indipendentemente dallo stato immunitario (vaccinati o non), è quasi del tutto ininfluenza ai fini della pericolosità del serbatoio d'infezione, condizione quest'ultima che potrebbe aprire ulteriori scenari in termini controllo epidemiologico.

APPENDICE 1

Gruppo di controllo

N.	TIM E	n-PCR	Rt-PCR	EMT M	IFAT	EMO-BIO	CLINICAL SIGNS	CONCLUSION
2	M9	pos	6.5	pos	1/640	WBC↓ RBC↓ PLT↓	Pale mucosae	Patent Symptomatic Infection
	M15	pos	5.3	pos	20480	WBC↓ RBC↓ PLT↓ Inverted A/G ratio TP ↑	Lymphadenopathy (pre-scapular, popliteal and mandibular)	Patent Symptomatic Infection
	M18	pos	6.6	pos	40960	RBC↓ PLT↓ Inverted A/G ratio TP ↑	Muscle atrophy - weight Loss Lymphadenopathy (pre-scapular and popliteal)	Patent Symptomatic Infection
	M20						Necropsy after euthanasia moderated hepatomegaly, splenomegaly, generalized lymphadenopathy, and alteration of kidney – Presence of parasites in spleen and liver	Euthanasized
3	M9	neg		neg	<1/40		Mild weight loss	Negative
	M15	pos	4.9	pos	320	PLT↓	Asymptomatic	Patent Asymptomatic infection
	M18	pos	6.5	pos	5120	RBC↓ PLT↓ Inverted A/G ratio	Lymphadenopathy (popliteal)	Patent Symptomatic infection
	M21	pos	6.7	pos	20480	RBC↓ Inverted A/G ratio	Pale mucosae weight loss Muscle atrophy	Patent Symptomatic Infection
	M23	Necropsy after natural death : moderated hepatomegaly with necrosis area, generalized lymphadenopathy, and nephritis						Dead

N.	TIM E	n-PCR	Rt-PCR	EMT M	IFAT	EMOBIO	CLINICAL SIGNS	CONCLUSION
5	M9	neg		neg	<1/40	PLT↓	asymptomatic	negative
	M15	neg		neg	<1/40	PLT↓	asymptomatic	negative
	M21	neg		neg	<1/40		Mild weight loss	negative
	M24 M25	Pos (faint)		neg	<1/40		asymptomatic	Subpatent infection
	M30	neg		neg	<1/40		Asymptomatic	negative
	M33	Pos		Neg	<1/40		asymptomatic	Subpatent infection
6	M9	pos	3.3	pos	<1/40	PLT↓	asymptomatic	Patent Asymptomatic Infection
	M15	pos	5.6	pos	5120	RBC↓ PLT↓ Inverted A/G ratio	Dry seborrhoea Muscle atrophy - Loss of weight Lymphadenopathy (pre-scapular)	Patent Symptomatic infection
	M18	pos	6.5	pos	20480	RBC↓ PLT↓ Inverted A/G ratio	Loss of weight Muscle atrophy Lymphadenopathy (pre-scapular and popliteal)	Patent Symptomatic Infection
	M20	Necropsy after euthanasia :hepatomegaly, moderated splenomegaly, generalized lymphadenopathy, and alteration of kidney – Presence of parasites in spleen and liver						Dead

N.	TIM E	n-PCR	Rt-PCR	EMT M	IFAT	EMOBIO	CLINICAL SIGNS	CONCLUSION
7	M9	neg		neg	<1/40	RBC↓	asymptomatic	negative
	M15	pos	3.8	pos	160	RBC↓	asymptomatic	Patent Asymptomatic Infection
	M18	pos	6.2	pos	1280	PLT↓	asymptomatic	Patent Asymptomatic Infection
	M21	pos	6.6	pos	20480	PLT↓ Inverted A/G ratio	Loss of weight Lymphadenopathy (pre-scapular) Splenomegaly	Patent Symptomatic Infection
	M24 M25	pos	6.3/6.4	pos	10240	RBC↓ PLT↓ WBC↓ Inverted A/G ratio TP ↑	Loss of weight Lymphadenopathy (popliteal)	Patent Symptomatic Infection
8	M9	neg		neg	<1/40	RBC↓ TP↓	severe weight loss, mild alopecia, mucosae pallor	negative
	M15	pos	1.7	(neg)	<1/40	PLT↓	asymptomatic	Subpatent Infection
	M18	pos	6.0	pos	320	PLT↓	Asymptomatic	Patent Asymptomatic Infection
	M21	pos	6.6	pos	10240	PLT↓ Inverted A/G ratio	Asymptomatic	Patent Asymptomatic Infection
	M24 M25	pos	6/5.5	pos	10240	RBC↓ PLT↓ Inverted A/G ratio TP ↑	Perakeratosis on nose Lymphadenopathy (pre-scapular and popliteal) mild weight loss	Patent Symptomatic Infection
	M30	pos		pos	1/5120	PLT↓ Inverted A/G ratio TP ↑	ulcers/nodules, pre-scapular enlarged	Patent Symptomatic Infection
	M33	Pos		Pos	1/2560	RBC↓ PLT↓ Inverted A/G ratio TP ↑	pre-scapular enlarged, poor body condition, muscle atrophy	Patent Symptomatic Infection

N.	TIM E	n- PCR	Rt- PCR	EMT M	IFAT	EMOBIO	CLINICAL SIGNS	CONCLUSION
9	M9	neg		neg	<1/40	TP↓	asymptomatic	Negative
	M18	pos	4.7	pos	<1/40	WBC↑ PLT↓	asymptomatic	Subpatent infection Patent asymptomatic infection
	M21	pos	6.7	pos	5120	WBC↑ PLT↓ Inverted A/G ratio TP ↑	asymptomatic	Patent Symptomatic Infection
	M24 M25	pos	5.8/6. 2	pos	10240	PLT↓ Inverted A/G ratio TP ↑	Lymphadenopathy (popliteal)	Patent Symptomatic Infection
10	M9	neg		neg	<1/40	RBC↓	asymptomatic	negative
	M18	pos	2.3	neg	<1/40	RBC↓	asymptomatic	Subpatent Infection
	M21	pos	4.7	pos	1/640	RBC↓ Inverted A/G ratio	Lymphadenopathy (pre- scapular)	Patent Symptomatic Infection
	M24 M25	pos	6.7/6. 6	pos	1/5120	RBC↓WBC↓ PLT↓ Inverted A/G ratio	spleen enlarged	Patent Symptomatic Infection
	M 30	pos		pos	1/2560	RBC↓PLT↓ Inverted A/G ratio TP ↑	prescapular and popliteal enlarged	Patent Symptomatic Infection
	M 33	pos		pos	1/5120	RBC↓PLT↓ Inverted A/G ratio TP ↑	onychogryphosis, prescapular and popliteal enlarged, port body condition, muscle atrophy	Patent Symptomatic Infection

N.	TIM E	n- PCR	Rt- PCR	EMT M	IFAT	EMOBIO	CLINICAL SIGNS	CONCLUSION
13	M9	neg		neg	<1/40	RBC↓ PLT↓	asymptomatic	negative
	M15	neg		neg	<1/40	PLT↓	asymptomatic	negative
	M18	neg		neg	<1/40	RBC↓	asymptomatic	negative
	M21	neg		neg	<1/40	RBC↓ PLT↓ TP↓	asymptomatic	negative
	M24 M25	pos		neg	1/80	RBC↓	asymptomatic	Subpatent Infection
19	M 9	neg		neg	<1/40	normal	asymptomatic	negative
	M 15	neg		neg	<1/40	PLT ↓	asymptomatic	negative
	M 18	neg		neg	<1/40	normal	asymptomatic	negative
	M21	neg		neg	1/80	normal	asymptomatic	negative
	M24 M25	Pos Faint		neg	1/40	normal	asymptomatic	Subpatent Infection
	M 30	pos		pos	1/40	normal	asymptomatic	Patent Asymptomatic Infection
	M 33	Pos		Pos	1/80	Normal	Asymptomatic	Patent Asymptomatic Infection

Gruppo vaccinati

N.	TIME	n-PCR	Rt-PCR	EMT M	IFAT	EMOBIO	CLINICAL SIGNS	CONCLUSION
21	M9	pos	4.3	pos	1/80	PLT↓ TP↑	Asymptomatic	Patent Asymptomatic Infection
	M15	pos	6.9	pos	1/320	RBC↓ PLT↓ TP↑ Inverted A/G ratio	Lymphadenopath y (pre-scapular and popliteal)	Patent Symptomatic Infection
	M18	pos	7.0	pos	1/1280	RBC↓ PLT↓ TP↑ Inverted A/G ratio	Lymphadenopath y (pre-scapular and popliteal)	Patent Symptomatic Infection
	M21	pos	6.9	pos	1/40960	RBC↓ PLT↓ TP↑ Inverted A/G ratio	Muscle atrophy Loss of weight Lymphadenopath y (pre-scapular and popliteal) Splenomegaly	Patent Symptomatic Infection
	M24 M25	Pos	6.3/N T	pos	1/20480	RBC↓ PLT↓ TP↑ Inverted A/G ratio	Muscle atrophy Enlarged spleen Lymphadenopath y (pre-scapular and popliteal)	Patent Symptomatic Infection
		Necropsy after euthanasia : dermal lesions mainly in head zone, hepatomegaly, splenomegaly, generalized lymphadenopathy, and alteration of kidney some amastigotes in some cells						Euthanasized

N.	TIME	n-PCR	Rt-PCR	EMT M	IFAT	EMOBIO	CLINICAL SIGNS	CONCLUSION
22	M 9	neg		neg	<1/40	PLT↓	asymptomatic	Negative
	M 15	neg		neg	<1/40	normal	asymptomatic	Negative
	M18	pos	2.8	pos	1/160	WBC↑	asymptomatic	Patent Asymptomatic Infection
	M21	pos	3.8	pos	1/640	normal	asymptomatic	Patent Asymptomatic Infection
	M24 M25	pos	6.1/4.1	pos	1/2560	PLT↓	asymptomatic	Patent Asymptomatic Infection
	M 30	pos		pos	1/5120	RBC↓ PLT↓ TP ↑ Inverted A/G ratio	popliteal enlarged	Patent Symptomatic Infection
	M 33	pos		pos	1/2560	Inverted A/G ratio	poor body condition, muscle atrophy	Patent Symptomatic Infection
28	M9	neg		neg	<1/40	normal	asymptomatic	negative
	M15	neg		neg	<1/40	RBC↓ PLT↓	asymptomatic	negative
	M18	neg		neg	<1/40	Normal	asymptomatic	negative
	M21	neg		neg	1/80	TP↓	asymptomatic	negative
	M24 M25	neg		neg	1/320	normal	asymptomatic	negative(vacc react ?)
	M30	pos		neg	1/80	normal	asymptomatic	Subpatent Infection
	M33	pos		pos	1/320	PLT↓	asymptomatic	Patent Asymptomatic Infection

N.	TIME	n-PCR	Rt-PCR	EMT M	IFAT	EMOBIO	CLINICAL SIGNS	CONCLUSION
36	M9	Pos (faint)		neg	<1/40	normal	asymptomatic	Subpatent Infection
	M15	Pos (faint)		neg	<1/40	normal	asymptomatic	Subpatent Infection
	M18	neg		neg	1/40	normal	Asymptomatic	negative
	M21	neg		neg	1/80	normal	Asymptomatic	negative
	M24 M25	Pos Faint	3.1/(-)	neg	1/640	normal	asymptomatic	Subpatent Infection
	M 30	neg		neg	1/80	normal	popliteal enlarged	negative
	M 33	pos		pos	1/40	RBC↓	asymptomatic	Patent Asymptomatic Infection
32	M9	pos		pos	<1/40	RBC↓ TP↓ PLT↓	asymptomatic	Patent Asymptomatic Infection
	M15	Pos (faint)		pos	1/40	TP↓ PLT↓	asymptomatic	Patent Asymptomatic Infection
37	M9	Pos Faint)		neg	1/40	normal	asymptomatic	Subpatent Infection
	M15	Pos (Faint)		neg	1/40	normal	asymptomatic	Subpatent Infection
	M18	neg		neg	1/40	normal	Asymptomatic	negative
	M21	neg		neg	1/40	normal	Asymptomatic	negative
	M24 M25	Pos (Faint)	2.4/(-)	neg	1/320	normal	asymptomatic	Subpatent Infection
	M30	neg		neg	1/40	normal	Asymptomatic	negative
	M33	pos		neg	<1/40	TP↓	Asymptomatic	Subpatent Infection

<i>N.</i>	<i>TIME</i>	<i>n-PCR</i>	<i>Rt-PCR</i>	<i>EMT M</i>	<i>IFAT</i>	<i>EMOBIO</i>	<i>CLINICAL SIGNS</i>	<i>CONCLUSION</i>
25	M 9	neg		neg	<1/40	PLT↓	Asymptomatic	negative
	M 15	neg		neg	<1/40	PLT↓	Asymptomatic	negative
	M 18	neg		neg	1/160	normal	Asymptomatic	Neg (vacc react ?)
	M 21	neg		neg	1/160	TP ↓	Asymptomatic	Neg (vacc react ?)
	M24 M25	neg		neg	1/320	normal	Asymptomatic	Neg (vacc react ?)
	M 30	neg		neg	1/160	normal	Asymptomatic	Neg (vacc react ?)
	M 33	pos		pos	1/160	RBC↓ PLT↓	Asymptomatic	Patent Asymptomatic Infection
42	M9	neg		neg	<1/40	normal	Asymptomatic	negative
	M15	neg		neg	1/40	PLT↓	Asymptomatic	negative
	M18	neg		neg	1/80	normal	Asymptomatic	negative
	M21	neg		neg	1/80	normal	Asymptomatic	negative
	M24 M25	Pos (faint)	3.2/(-)	neg	1/320	normal	Asymptomatic	Subpatent Infection
	M30	pos		pos	1/160	normal	asymptomatic	Patent Asymptomatic Infection
	M33	pos		pos	1/640	RBC↓ PLT↓ TP↓	poor body condition	Patent Symptomatic Infection

Bibliografia

- ¹ Urquhart G.M., J. Armour, J.L. Duncan, A.M. Dunn, F.W. Jennings – Parassitologia Veterinaria. 1985: 254-261.
- ² Gradoni L, Gramiccia M, Pozio E. "Status of the taxonomy of Leishmania from the Mediterranean basin". Parassitologia. 1984 Dec; 26 (3): 289-97.
- ³ Koutinas AF. et al. "Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996)". J Am Anim Hosp Assoc. 1999 Sep-Oct; 35 (5): 376-83.
- ⁴ Ciaramella et al. "A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected with *L. infantum*". Vet Rec 141: 539-543.
- ⁵ World Health Organization 1990.
- ⁶ Gaeta GB, Gradoni L, Gramiccia M, di Martino L, Pizzuti R, Pempinello R, Scotti S, Maisto A. "Visceral leishmaniasis in Italy. Its epidemiology, clinical picture and therapy" Recent Prog Med. 1994 Jun; 85 (6): 340-7.
- ⁷ Euzeby J. "Protozoologie medical comparee". Vol I. Lyon: Foundation Marcel Merieux, 1986: 212-314. citato in Koutinas et al. J Am An Hosp Assoc 1999; 35: 376-83.
- ⁸ Guimaraes KS, Batista ZS, Dias EL, Guerra RM, Costa AD, Oliveira AS, Calabrese KS, Cardoso FO, Souza CS, do Vale TZ, Goncalves da Costa SC, Abreu-Silva AL. "Canine visceral leishmaniasis in São José de Ribamar, Maranhão State, Brazil". Vet Parasitol. 2005 Aug 10; 131 (3-4): 305-9.
- ⁹ Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. Trends Parasitol. 2006 Dec; 22(12): 552-7. Epub 2006 Oct 4.
- ¹⁰ WHO, 1993. "The Leishmaniasis". CTD/MIP/WP.93.8, WHO/HQ. Genere
- ¹¹ Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2004 Sep; 27(5): 305-18.
- ¹² Pozio E, Gradoni L, Gramiccia M. "Canine leishmaniasis in Italy from 1910 to 1993" Ann Parasitol Hum Comp. 1985; 60 (5): 543-53.
- ¹³ Gradoni L., Gramiccia M., Khoury C., Maroli M. – ISSN 1123-3117 Rapporti ISTISAN 04/12 Istituto Superiore Di Sanità – Linee guida per il controllo del serbatoio canino della leishmaniosi viscerale zoonotica in Italia. Dall'ISS le linee guida per la leishmaniosi viscerale zoonotica.
- ¹⁴ Mancianti F, Gradoni L, Gramiccia M, Pieri S, Marconcini A. "Canine leishmaniasis in the Isle of Elba, Italy". Trop Med Parasitol. 1986 Jun; 37 (2): 110-2.

-
- ¹⁵ Cascio A, Gradoni L, Scarlata F, Gramiccia M, Giordano S, Russo R, Scalone A, Camma C, Titone L. "Epidemiologic surveillance of visceral leishmaniasis in Sicily, Italy". *Am J Trop Med Hyg*. 1997 Jul; 57 (1): 75-8.
- ¹⁶ Baldi L. "Progetto pilota per il controllo della leishmaniosi viscerale in Italia". *Leishmaniosi canina: nuove prospettive*. Scivac 1998.
- ¹⁷ Gramiccia M. "Old world leishmaniasis". *Ann Ist Super Sanità*. 1997; 33 (2): 231-9.
- ¹⁸ Solano-Gallego, L., et al., Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* (2009), doi:10.1016/j.vetpar.2009.05.022
- ¹⁹ Maroli M, Gramiccia M, Gradoni L, Troiani M, Ascione R. "Natural infection of *Phebotomus Perniciosus* with MON 72 zymodeme of *Leishmania infantum* in the Campania region of Italy". *Acta trop*. 1994. 57: 333-335.
- ²⁰ Urquhart G.M., J. Armour, J.L. Duncan, A.M. Dunn, F.W. Jennings – *Parassitologia Veterinaria*. 1985: 254-261.
- ²¹ Sacks DL.; Perkins PV. 1984. *Science* 223: 1417-1419.
- ²² Davis Cr. Et al., 1990. *Parassitology* 101: 337-343.
- ²³ Green. -*Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 73: 685-698.
- ²⁴ Dujardin J. et coll, "Contributi della diagnostica molecolare: dalla classificazione di *Leishmania* all'epidemiologia descrittiva" da *Leishmaniosi canina: recenti acquisizioni su epidemiologia, implicazioni cliniche, diagnosi, terapia e prevenzione*. A.A. 2010.
- ²⁵ Dye C. "The logic of visceral leishmaniosis control". *Am J Trop Med Hyg* 1996 55: 125-130.
- ²⁶ Enserik M. "Infectious diseases. Has leishmaniasis become endemic in the U.S.?". *Science* 2000 290: 1881-1883
- ²⁷ Silva E.S. et al. "Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil". *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001 96: 285-291.
- ²⁸ Maroli M, Rossi L, Baldelli R, Capelli G, Ferroglia E, Genchi C, Gramiccia M, Mortarino M, Pietrobelli M, Gradoni L. "The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors." *Trop Med Int Health*. 2008 Feb;13(2):256-64.
- ²⁹ Morosetti G, Bongiorno G, Beran B, Scalone A, Moser J, Gramiccia M, Gradoni L, Maroli M. "Risk assessment for canine leishmaniasis spreading in the north of Italy." *Geospat Health*. 2009 Nov;4(1):115-27.

-
- ³⁰ Ferroglio E, Romano A, Dettoni F, Trisciungoglio A. "Distribution of *Phlebotomus perniciosus* in North-Italy: a study on 18S rDNA of phlebotomine sand flies." *Vet Parasitol.* 2010 May 28;170(1-2):127-30. Epub 2010 Feb 4.
- ³¹ Gradoni L, Scalone A, Gramiccia M, Troiani M. "Epidemiological surveillance of leishmaniasis in HIV-1-infected individuals in Italy". *AIDS.* 1996 Jun; 10 (7): 785-91.
- ³² di Martino L, Gramiccia M, Occorsio P, Di Muccio T, Scalone A, Gradoni L. [Infantile visceral leishmaniasis in the Campania region, Italy: experience from a Paediatric Referral Centre] *Parassitologia.* 2004 Jun;46(1-2):221-3.
- ³³ Gradoni L, Gramiccia M, Scalone A. "[Change in human visceral leishmaniasis treatment in Italy: retrospective study of 630 patients]" *Parassitologia.* 2004 Jun;46(1-2):199-201.
- ³⁴ Gradoni L, Gramiccia M, Scalone A. "Visceral leishmaniasis treatment, Italy." *Emerg Infect Dis.* 2003 Dec;9(12):1617-20.
- ³⁵ Gradoni et al. "Recrudescence of visceral leishmaniasis unrelated to HIV infection in the Campania region of Italy". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1996 90: 234-235
- ³⁶ Capelli G, Baldelli R, Ferroglio E, Genchi C, Gradoni L, Gramiccia M, Maroli M, Mortarino M, Pietrobelli M, Rossi L, Ruggiero M. "Monitoring of canine leishmaniasis in northern Italy: an update from a scientific network". *Parassitologia.* 2004 Jun; 46 (1-2): 193-7.
- ³⁷ Ferroglio E. et al. "Canine Leishmaniasis, Italy". *Emerg Infect Dis* Vol. 11, N. 10 Oct 2005.
- ³⁸ Gradoni L., Di Muccio T., Scalone A., Gramiccia M. "La leishmaniosi nel sud europa: importazione di parassiti ed espansione dei focolai endemici". da *Leishmaniosi canina: recenti acquisizioni su epidemiologia, implicazioni cliniche, diagnosi, terapia e prevenzione.* 2010.
- ³⁹ Mansueto S., 1989. *Le leishmaniosi umane.* SCIVAC, 10, 87-89.
- ⁴⁰ Gradoni L., Gramiccia M., Pozio E., 1984. *Stato attuale della tassonomia di Leishmania nel bacino del Mediterraneo.* *Parassitologia,* 26, 289-297.
- ⁴¹ Bettini S., Gramiccia M., Gradoni L., Pozio E., Mugnai S., Maroli M., 1983. *Leishmaniasis in Tuscany (Italy) VIII. Human population response to Leishmania in the focus of Monte Argentario (Grosseto) and epidemiological evaluation.* *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée,* 58, 539-547.
- ⁴² Gramiccia M., 1997. *La Leishmania del Vecchio Mondo.* *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità,* 33, 231-239.

-
- ⁴³ Gramiccia M., 1997. *La Leishmania del Vecchio Mondo*. Annali dell'Istituto Superiore di Sanità, 33, 231-239.
- ⁴⁴ Maroli M., Gramiccia M., Gradoni L., Troiani M., Ascione R., 1994. *Natural infection of Phlebotomus perniciosus with MON 72 zymodeme of Leishmania infantum in the Campania region of Italy*. Acta Tropica, 57, 333-335.
- ⁴⁵ Gradoni L., Gramiccia M., Pozio E., 1984. *Stato attuale della tassonomia di Leishmania nel bacino del Mediterraneo*. Parassitologia, 26, 289-297.
- ⁴⁶ Rioux J. A., Lanotte G., Pratlong F., Dereuve J., Jarry D., Moreno G., Killick-Kendrick R., Perieres J., Guilvard E., Belmonte A., Portus M., 1985. *La leishmaniose cutanée dans le Sud-Est de la France. Résultats d'une enquête éco-épidémiologique dans les Pyrénées Orientales*. Médecine et Maladies Infectieuses, 11, 650-656.
- ⁴⁷ Gramiccia M., 1997. *La Leishmania del Vecchio Mondo*. Annali dell'Istituto Superiore di Sanità, 33, 231-239.
- ⁴⁸ Bettini S., Gramiccia M., Gradoni L., Biggio P., Cottoni F., Pau M., Atzeni M.C., 1990. *Leishmaniasis in Sardinia IV. Epidemiological appraisal of cutaneous leishmaniasis and biochemical characterization of isolates*. Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 93, 262-269.
- ⁴⁹ Gradoni L., Scalone A., Gramiccia M., Troiani M., 1996b. *Epidemiological surveillance of leishmaniasis HIV-1 infected individuals in Italy*. AIDS, 10, 785-791.
- ⁵⁰ Baldelli R., Batteli G., Poglayen G., 1999. *Zoonoses and other health problems connected with the coexistence of man-dog-cat in normal situations and emergencies*. CEMEC-WHO/FAO CC UPH course. Management of dog and cat populations in normal and disaster situation. S. Marino, 18-20 Marzo 1999.
- ⁵¹ Mancianti F., Gradoni L., Pieri S., Marroncini A., 1986. *Canine leishmaniasis in the isle of Elba, Italy*. Tropical Medicine and Parasitology, 37, 110-112.
- ⁵² Molina R., 1997. *Dogs infectivity and control*. IZSS/MZCC/WHO Workshop on New Trends in Leishmaniasis Epidemiology and Control in the Mediterranean area. Palermo (Italy), 11-13 September 1997.
- ⁵³ Maroli M., Rossi L., Baldelli R., Capelli G., Ferroglio E., Genchi C., Gramiccia M., Mortarino M., Pietrobelli M., Gradoni L., 2008. *The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors*. Tropical Medicine & International Health, 13, 256-264.
- ⁵⁴ Marin A., Squaranti C., Cometti M., Boni V., 1994. *Diagnosi della leishmaniosi nel cane*. O.D.V.: Obiettivi e Documenti Veterinari, 15, 9-13.
- ⁵⁵ Baldelli R., Di Francesco A., 1992. *Leishmaniosi in Italia: risultati di indagini sierologiche condotte su cani di diversa provenienza geografica*. Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie, 46, 1395-1399.

-
- ⁵⁶ Rossi L., Ferroglio E., Guiso P., Ferrarsi P., Pancaldi P., 1999. *Segnalazione di un focolaio di leishmaniosi canina sulla collina torinese*. *Medicina Veterinaria Preventiva* 20, 20.
- ⁵⁷ Capelli G., Baldelli R., Ferroglio E., Genchi C., Gradoni L., Gramiccia M., Maroli M., Mortarino M., Pietrobelli M., Rossi L., Ruggiero M., 2004. *Monitoraggio della leishmaniosi canina in Nord Italia: aggiornamenti da un network scientifico*. *Parassitologia*, 46, 193-198.
- ⁵⁸ Maroli M., Sansoni L., Biglicchi F., Khoury C., Valsecchi M., 1995. *Reperimento di Phlebotomus neglectus Tonnoir, (= P. major s.l.) in un focolaio di leishmaniosi del Nord Italia (provincia di Verona)*. *Parassitologia*, 37, 241-244.
- ⁵⁹ Baldelli R., Di Francesco A., 1997. *Sorveglianza della leishmaniosi canina in Emilia-Romagna*. *Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie*, 51, 325-326.
- ⁶⁰ Gradoni L., 1999. *Epizootiology of canine leishmaniasis in southern Europe*. In: Killick-Kendrick R. (Ed.), *Canine Leishmaniasis: An Update*. Hoechst Roussel Vet. Wiesbaden, 32-39.
- ⁶¹ Pampiglione S., Schlick G., La Placa M., 1974. *Studies on Mediterranean leishmaniasis. I. An outbreak of visceral leishmaniasis in Northern Italy*. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 68, 349-359.
- ⁶² Gradoni L., Pizzuti R., Scalone A., Russo M., Gramiccia M., Di Martino L., Pempinello R., Gaeta G.B., 1996a. *Recrudescenze of visceral leishmaniasis unrelated to HIV infection in the Campania region of Italy*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 90, 234-235.
- ⁶³ Gradoni L., Di Muccio T., Scalone A., Gramiccia M. "La leishmaniosi nel sud europa: importazione di parassiti ed espansione dei focolai endemici." da *Leishmaniosi canina: recenti acquisizioni su epidemiologia, implicazioni cliniche, diagnosi, terapia e prevenzione*. 2010.
- ⁶⁴ Michele Maroli, Luca Rossi, Raffaella Baldelli, Gioia Capelli, Ezio Ferroglio, Claudio Genchi, Marina Gramiccia, Michele Mortarino, Mario Pietrobelli, Luigi Gradoni "The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors" *Tropical Medicine and International Health* volume 13 no 2 pp 256–264 february 2008
- ⁶⁵ Maroli M. et al. "I flebotomi in Italia: osservazione sulla distribuzione e sui metodi di campionamento". *Parassitologia* 1991 36: 251-261.
- ⁶⁶ Michele Maroli, Luca Rossi, Raffaella Baldelli, Gioia Capelli, Ezio Ferroglio, Claudio Genchi, Marina Gramiccia, Michele Mortarino, Mario Pietrobelli, Luigi Gradoni "The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors" *Tropical Medicine and International Health* volume 13 no 2 pp 256–264 february 2008

-
- ⁶⁷ Giulia Morosetti, Gioia Bongiorno, Bernadett Beran, Aldo Scalone, Judith Moser, Marina Gramiccia, Luigi Gradoni, Michele Maroli "Risk assessment for canine leishmaniasis spreading in the north of Italy" *Geospatia Health* 4(1), 2009, pp. 115-127
- ⁶⁸ Owens SD, Oakley DA, Marryott K, Hatchett W, Walton R, Nolan TJ, Newton A, Steurer F, Schantz P, Giger U. "Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs." *J Am Vet Med Assoc*. 2001 Oct 15;219(8):1076-83.
- ⁶⁹ Silva FL, Oliveira RG, Silva TM, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2009 Mar 9;160(1-2):55-9. Epub 2008 Nov 1.
- ⁷⁰ Rosypal AC, Troy GC, Zajac AM, Frank G, Lindsay DS. "Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle." *J Parasitol*. 2005 Aug;91(4):970-2.
- ⁷¹ Vidoe et al. "Le chancre d'inoculation dans la leishmaniose canine à *leishmania infantum*. Etude d'une cohorte en region cevenole". *Pratique medicale et chirurgicale de l'animal de compagnie*. 1991. 26: 133-7
- ⁷² Hermoso T. et al. "Leishmanial proteine kinases phosphorylate components of the complement cascade". *Embo J*. 1991 10, 4061-4067.
- ⁷³ Sacerdoti - Sierra N. et al. "Leishmanial proteine kinases and parasite survival". *Acta Parasitol. Turc*. 1997. 21 (Suppl.), 3
- ⁷⁴ Bogdan C. et al. "The immune response to *Leishmania*: mechanism of parasite control and evasion". *Intern J. Parasitol*. 1998 28, 121-134.
- ⁷⁵ Murray H.W., Edelson P.J. "Susceptibility of *Leishmania* to oxygen intermediates and killing by normal macrophages". *J. Exp. Med*. 1981. 153: 1302-1315.
- ⁷⁶ Desjardinis M. et al. "Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *leishmania* lipophosphoglycan". *J. Exp. Med*. 185, 2061-2068.
- ⁷⁷ Medina – Acosta E. et al. 1989. "The promastigote surface protease (gp63) of *leishmania* is expressed but differentially processed and localized in the amastigote stage".
- ⁷⁸ Mcneely T.B. et al. "Inhibitory effect on protein kinase C activity by lipophosphoglycan fragments and glycosylphosphatidylinositol antigens of the protozoan parasite *leishmania*". *Biochem. J.*, 1989 259, 601-604
- ⁷⁹ Manuel J. "Macrophage-parasite interactions in *leishmania* infections". *J. Leukoc. Biol*. 1990. 47:187-193.

-
- ⁸⁰ Scott P. 1985. *Parasite Immunol.* 7: 277-278.
- ⁸¹ Misefari A., Jrillo E. (1993) *Immunologia*. Ed EDISES
- ⁸² Manetti R. et al. "Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) induces T helper type 1 (Th-1) – specific immune responses and inhibits the development of IL-4 producing Th cells". *J. Exp. Med* 1993. 177, 1199-1204.
- ⁸³ Hsieh C.S. et al. "Development of Th1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria* induced macrophages". *Science* 1993, 260, 547-549.
- ⁸⁴ Primez C. et al. "Cytokine patterns in the pathogenesis of human Leishmaniasis". *J. Clin. Invest* 1993. 91, 1390-1395.
- ⁸⁵ Pinelli E. et al. "Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*". *Infect. Immun.* 1994. 62, 229-235.
- ⁸⁶ Locksley R.M. et al. "Susceptibility to Infectious Diseases: leishmania as a Paradigm". *The Journal of Infectious Diseases* 1999; 179 suppl 2: 305-8.
- ⁸⁷ Lima V.M. et al. "Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis". *Braz J Med Biol res.* 2003 Apr; 36 (4): 485-9. Epub 2003 Apr 8.
- ⁸⁸ Garcia-Alonso M. et al. "Presence of antibodies in the aqueous humor and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infection in dogs. Pathological features at the central nervous system". *Parasite Immunol.* 1996 Nov; 18 (11): 539-46.
- ⁸⁹ Alvar J et al. "Canine leishmaniasis". *Adv Parasitol* 57: 1-88, 2004.
- ⁹⁰ dos-Santos W.L. et al. "Association between skin parasitism and a granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniasis". *Parasitol Res.* 2004 Jan; 92 (2): 89-94. Epub 2003 Nov 11.
- ⁹¹ Oliva G., 1998. *Aspetti clinico-terapeutici della leishmaniosi del cane*. Atti SCIVAC, Avellino 10 maggio 1998.
- ⁹² Slappendel R.J. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. *Vet Q* 1988;10:1–16.
- ⁹³ Solano-Gallego L, Riera C, Roura X, et al. *Leishmania infantum* specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Vet Parasitol* 2001;96:265–276.
- ⁹⁴ Oliva G. et al. "Canine leishmaniasis: evolution of the chemotherapeutic protocols". *Parassitologia.* 2004 Jun; 46 (1-2): 2311-4.
- ⁹⁵ Paltrinieri S. et al. "guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs". *JAVMA*, vol 236, No. 11, giugno 1, 2010.

-
- ⁹⁶ Buonaccorsi. Le malattie del cane e del gatto. Ed. "Essegi", Bologna 1995:30
- ⁹⁷ Ciaramella P., De Luna R. "Leishmaniosi del cane: aspetti clinico diagnostici" Obiett. Doc. Vet. 1999; 4 suppl.: 13-25
- ⁹⁸ Noli C. "La leishmaniosi del cane". Waltham Focus 1999 ;9 (2): 16-24
- ⁹⁹ Ferrer LM "Clinical aspects of canine leishmaniasis". In: Killick-Kendrick, R (ed): Canine leishmaniasis: an update. Proc. Int. Can. Leishm. Forum, Barcelona, Spain, 1999, Intervet Boxmeer, The Netherlands, pp 6-10, 1999
- ¹⁰⁰ Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Castagnaro M, Crotti A, Maroli M, Oliva G, Roura X, Zatelli A, Zini E; Canine Leishmaniasis Working Group, Italian Society of Veterinarians of Companion Animals. "Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs." J Am Vet Med Assoc. 2010 Jun 1;236(11):1184-91.
- ¹⁰¹ Giunchetti RC, Martins-Filho OA, Carneiro CM, Mayrink W, Marques MJ, Tafuri WL, Corrêa-Oliveira R, Reis AB. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. Vet Immunol Immunopathol. 2008 Jan 15;121(1-2):23-33. Epub 2007 Jul 25.
- ¹⁰² Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides LS, Koutinas AF, Billinis C, Kontos VI.
Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. Am J Trop Med Hyg. 2005 Jul;73(1):82-6.
- ¹⁰³ Ruiz de Gopegui R et al. Causes of lymphadenopathy in dog and cat. Vet Rec 2004 155(1):23-4
- ¹⁰⁴ Vamvakidis CD. "Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*)". Vet Rec. 2000 Jun 10; 146 (24): 698-703.
- ¹⁰⁵ Cortese L, Pelagalli A, Piantedosi D, Mastellone V, Manco A, Lombardi P, Ciaramella P, Avallone L. "Platelet dysfunction in dogs naturally infected with *Leishmania* and/or *Ehrlichia* infection". PLATELETS 2004. 15,6,361.
- ¹⁰⁶ Corona M, Ciaramella P, Pelagalli A, Cortese L, Pero ME, Santoro D, Lombardi P. "Haemostatic disorders in dog naturally affected by *Leishmania infantum*". Vet res com 28 suppl 1, 131-334, ISSN: 0165-7380 IF 0.669
- ¹⁰⁷ Blouin P..Uveitis in the dog and cat: causes, diagnosis and treatment. Can Vet J. 1984 Aug;25(8):315-23

¹⁰⁸ Peña MT, Roura X, Davidson MG Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998). *Vet Ophthalmol.* 2000;3(1):35-41.

¹⁰⁹ Peña MT, Naranjo C, Klauss G, Fondevila D, Leiva M, Roura X, Davidson MG, Dubielzig RR. Histopathological features of ocular leishmaniosis in the dog. *J Comp Pathol.* 2008 Jan;138(1):32-9. Epub 2007 Nov 28.

¹¹⁰ Crotti A. le patologie in corso di Leishmaniosi canina. da Leishmaniosi canina: recenti acquisizioni su epidemiologia, implicazioni cliniche, diagnosi, terapia e prevenzione. A.A. 2010.

¹¹¹ Pena MT. et al. "Ocular and periocular manifestation of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998)". *Vet Ophthalmol.* 2000; 3 (1): 35-41.

¹¹² Peña MT, Naranjo C, Klauss G, Fondevila D, Leiva M, Roura X, Davidson MG, Dubielzig RR. Histopathological features of ocular leishmaniosis in the dog. *J Comp Pathol.* 2008 Jan;138(1):32-9. Epub 2007 Nov 28.

¹¹³ Opiz M. "Skin manifestations in leishmaniasis in dogs". *Tierarztl prax.* 1996 Jun; 24 (3):284-91.

¹¹⁴ dos-Santos WL, David J, Badaro R, de-Freitas LA. "Association between skin parasitism and a granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniosis". *Parasitol Res.* 2004 Jan; 92 (2): 89-94. Epub 2003 Nov 11.

¹¹⁵ Koutinas AF, Saridomichelakis MN "il coinvolgimento cutaneo nella leishmaniosi canina" da da Leishmaniosi canina: recenti acquisizioni su epidemiologia, implicazioni cliniche, diagnosi, terapia e prevenzione. 2010.

¹¹⁶ Koutinas AF, Saridomichelakis MN, il coinvolgimento cutaneo nella Leishmaniosi canina. Da Leishmaniosi canina: recenti acquisizioni su epidemiologia, implicazioni cliniche, diagnosi, terapia e prevenzione. A.A. 2010.

¹¹⁷ Papadogiannakis EI, Koutinas AF, Saridomichelakis MN, Vlemmas J, Lekkas S, Karameris A, Fytianou A. Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). *Vet Immunol Immunopathol.* 2005 Apr 8;104(3-4):227-37.

¹¹⁸ Ciaramella P. & Corona, Canine leishmaniasis : clinical e diagnostic aspects. *Compendium of Continuiuo Education for the Practicing Veterian* 25, 358-368

¹¹⁹ Koutinas AF, Saridomichelakis MN, il coinvolgimento cutaneo nella Leishmaniosi canina. Da Leishmaniosi canina: recenti acquisizioni su epidemiologia, implicazioni cliniche, diagnosi, terapia e prevenzione. A.A. 2010.

¹²² Zatelli A, Borgarelli M, Santilli R, Bonfanti U, Nigrisoli E, Zanatta R, Tarducci A, Guarraci "A.Glomerular lesion in dogs infected with *Leishmania* organism". *Am J Vet Res.* 2003 May; 54 (5): 558-61.

-
- ¹²³ Benderitter T. et al. "Glomerulonephritis in dogs with canine leishmaniasis". *Ann Trop Med Parasitol*. 1988 Aug; 82 (4): 335-41.
- ¹²⁴ Maciati et al. "Analysis of renal immune-deposits in canine leishmaniasis. Preliminary results". *Parassitologia* 31: 213-230. 1989.
- ¹²⁵ Ferrer L. 1992. "Leishmaniosis Kirk's current veterinary therapy" XI, ed. W.B. Saunders. Philadelphia: 266-270.
- ¹²⁶ Zini et al. "Diagnostic relevance of qualitative proteinuria evaluated by use of sodium dodecyl findings in dogs". *Am J Vet Res* 65: 964-971, 2004.
- ¹²⁷ Gorge J.W. et al. "Canine leishmaniasis with amiloidosis". *Vet pathol*. 1976; 13 (5): 365-73.
- ¹²⁸ Blavier et al.(2001) "Atypical forms of canine leishmaniosis". *Vet J*. 2001 Sep; 162 (2): 108-20.
- ¹²⁹ Fisa R, Gállego M, Castillejo S, et al. Epidemiology of canine the Gargano promontory (Apulia, South Italy). *Eur J Epidemiol* 1992;8:273–276.
- ¹³⁰ Brandonisio O, Carelli G, Ceci L, et al. Canine leishmaniasis in leishmaniosis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. *Vet Parasitol* 1999;83:87–97.
- ¹³¹ Abranches P, Silva-Pereira MCD, Conceição-Silva F, et al. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol* 1991;77:557–561.
- ¹³² Sanchez-Robert E, Altet L, Sanchez A, et al. Polymorphism of SLC11 a1 (Nrampl) gene and canine leishmaniasis in a case-control study. *J Hered* 2005;96:755–758.
- ¹³³ Santos-Gomes GM, Rosa R, Leandro C, et al. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol* 2002;88:21–
- ¹³⁴ Gomes YM, Paiva Cavalcanti M, Lira RA, Abath FG, Alves LC. "Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances". *Vet J*. 2006 Dec 4.
- ¹³⁵ Oliva G, Scalone A, Foglia Manzillo V, Gramiccia M, Pagano A, Di Muccio T, Gradoni L, 2006. *Incidence and time course of Leishmania infantum infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons*. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 1318-1322.
- ¹³⁶ Berrahal F, Mary C, Roze M, Berenger A, Escoffier K, Lamouroux D, Dunan S. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg*. 1996 Sep;55(3):273-7.

-
- ¹³⁷ Strauss-Ayali D, Jaffe CL, Burshtain O, Gonen L, Baneth G. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *J Infect Dis*. 2004 May 1;189(9):1729-33. Epub 2004 Apr 13
- ¹³⁸ Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol*. 2001 Feb;39(2):560-3.
- ¹³⁹ Cappiello S., Di Muccio T.¹, Fiorentino E., Foglia Manzillo V., Gradoni L.¹, Gramiccia M.¹ Oliva G., "The potential role of conjunctival swab analysis for the early detection of *leishmania*-dog contacts: a preliminary study" **Atti SISVET 2009**
- ¹⁴⁰ Chulay J.D., Bryceson A.D., 1983. *Quantitation of amastigotes of Leishmania donovani in smears of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 32, 475-479.
- ¹⁴¹ Ciaramella P., Oliva G., De Luna R., Gradoni L., Ambrosio R., Cortese L., Scalone A., Persechino A., 1997. *A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by Leishmania infantum*. *Veterinary Record*, 141, 539-543.
- ¹⁴² Oliva G, Scalone A, Foglia Manzillo V, Gramiccia M, Pagano A, Di Muccio T, Gradoni L, 2006. *Incidence and time course of Leishmania infantum infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons*. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 1318-1322.
- ¹⁴³ Xavier S., Andrade H., Haddad S., Chiarelli I., Lima W., Michalick M., Tafuri W., Tafuri W., 2006. *Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detecting Leishmania infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods*. *BMC Veterinary Research*, 2, 17.
- ¹⁴⁴ Tafuri W., Santos R., Arantes R., Goncalves R., Melo M., Michalick M., Tafuri W., 2004. *An alternative immunohistochemical method for detecting Leishmania amastigotes in paraffin-embedded canine tissues*. *Journal of Immunological Methods*, 292, 17-23.
- ¹⁴⁵ Van Eys G.J.J.M., Schoone G.J., Kroon N.C.M., Ebeling S.B., 1992. *Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use detection and identification of Leishmania parasites*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 51, 133-142.
- ¹⁴⁶ Mathis *et al*, 1995 Mathis A., Deplazes P., 1995. *PCR and in vitro cultivation for detection of Leishmania spp. In diagnostic samples from humans and dogs*. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 1145-1149.
- ¹⁴⁷ Berrahal F., Mary C., Roze M., Berenger A., Escoffier K., Lamouroux D., Dunan S., 1996. *Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase*

chain reaction and immunoblotting. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 55, 273-277.

¹⁴⁸ Berrahal F., Mary C., Roze M., Berenger A., Escoffier K., Lamouroux D., Dunan S., 1996. *Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 55, 273-277

¹⁴⁹ Di Muccio T., Scalone A., Ludovia A., Orsini S., Brianti E., Gaglio G., Forino D., Idone P., Libranti L., Gradoni L., Poglayen G., Gramiccia M., Giannetto S., 2004. *Comparative performance of serological, parasitological and molecular techniques for the detection of canine leishmaniasis in the endemic focus of Salina Island, Italy*. Atti XXIII SOIPA, Vietri sul Mare (SA), 09-12/06/2004. Parassitologia, 46 (suppl. 1).

¹⁵⁰ Strauss-Ayali D., Jaffe C.L., Burshtain O., Gonen L., Baneth G., 2004. *Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of Leishmania infantum DNA in dogs*. The Journal of Infectious Diseases, 189, 1729-1733.

¹⁵¹ Ferreira *et al.*, 2008 Ferreira S. de A., Ituassu L.T., de Melo M.N., de Andrade A.S.R., 2008. *Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil*. Veterinary Parasitology, 152, 257-263.

¹⁵³ (Gomes *et al.*, 2008 Gomes Y., Cavalcanti M., Lira R., Abath F., Alves L., 2008. *Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological avances*. Veterinary Journal, 175, 45-52.

¹⁵⁴ Manna L., Reale S., Vitale F., Pavone L., Gravino A.E., 2007. *Real-time PCR assay in Leishmania-infected dogs treated with meglumine antimonite and allopurinol*. Veterinary Journal, 177, 279-282.

¹⁵⁵ Dye c. et al 1993 Epidemiol Infect 110: 647-656

¹⁵⁶ Gradoni L., Gramiccia M. "Leishmaniasis", in OIE manual of standards for diagnosis tests and vaccine, 4th ed. Office International des Epizooties, Paris, France, 2000 p. 803-812 .

¹⁵⁷ Gradoni, 2002. "The diagnosis of canine leishmaniasis". In Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. Ed. R. Killick-Kendrick Intervet International, Boxmeer, NL.

¹⁵⁸ Furlanello T., M. Caldin, S. Tasca, L. Razia Laboratorio d'Analisi Veterinarie "San Marco", (Padova).

¹⁵⁹ Mancianti F., Meciani N., 1988b. *Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and counterimmunoelectrophoresis*. American Journal of Veterinary Research, 49, 1409-1411.

-
- ¹⁶⁰ Piergili Fioretti D., Curti M., Vitellozzi G., 1981. *La prova di immunofluorescenza nella diagnosi sierologia della leishmaniosi canina*. Parassitologia, 23, 223-225.
- ¹⁶¹ Scalone A., De Luna R., Oliva G., Baldi L., Satta G., Vesco G., Mignone W., Turilli C., Mondesire R.R., Simpson D., Donoghue A.R., Frank G.R., Gradoni L., 2002. *Evaluation of the Leishmania recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay*. Veterinary Parasitology, 104, 275-285.
- ¹⁶² Campino L., Santos-Gomes G., Rica-Capela M., Cortes S., Abranches P., 2000. *Infectivity of promastigotes and amastigotes of Leishmania infantum in a canine model for leishmaniosis*. Veterinary Parasitology, 97, 269-275.
- ¹⁶³ Bernadina W., Luna R., Oliva G., Ciaramella P., 1997. *An immunodiffusion assay for the detection of canine leishmaniasis due to infection with Leishmania infantum*. Veterinary Parasitology, 73, 207-213.
- ¹⁶⁴ Gradoni L., 2002. *The diagnosis of canine leishmaniasis*. In: Killick-Kendrick R. (Ed.), Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. Intervet International, Boxmeer, 7-14.
- ¹⁶⁵ Ferroglio E., Centaro E., Mignone W., Trisciuglio A., 2007. *Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of Leishmania infantum infection in dog as compared with immunofluorescence assay and western blot*. Veterinary Parasitology, 144, 162-166.
- ¹⁶⁶ Iniesta L., Gallego M., Portus M., 2007. *Idiotypic expression of IgG1 and IgG2 in dogs naturally infected with Leishmania infantum*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 103, 77-81.
- ¹⁶⁷ Rosypal A.C., Gogal R.M., Zajac A.M., Troy G.C., Lindsay D.S., 2005. *Flow cytometric analysis of cellular immune responses in dogs experimentally infected with a North American isolate of Leishmania infantum*. Veterinary Parasitology, 131, 45-51.
- ¹⁶⁸ Živicnjak T., Martinkovic F., Marinculic A., Mrljak V., Kucer N., Matijatko V., Mihaljevic Z., Baric-Rafaj R. "A seroepidemiologic survey of canine visceral leishmaniosis among apparently healthy dogs in Croatia". 2005 Vet parasitol 131; 35-43
- ¹⁶⁹ Ribeiro FC, Schubach Ade O, Mouta-Confort E, Schubach TM, Madeira Mde F, Marzochi MC. "Use of ELISA employing Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Leishmania) chagasi antigens for the detection of IgG and IgG1 and IgG2 subclasses in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in dogs". Vet Parasitol. 2007 Sep 30; 148 (3-4): 200-6. Epub 2007 Aug 6.
- ¹⁷⁰ Plevraki K. et al. "Effect of allopurinol treatment on the progression of chronic nephritis in canine leishmaniasis (Leishmania infantum)". J Vet Intern Med 20: 228-233, 2006
- ¹⁷¹ Keenam CM et al 1984 Vet pathol. 21: 74-79.

¹⁷² Ciaramella et al. "A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected with *L. infantum*". Vet Rec 141: 539-543.

173 Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G.

Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. Vet Parasitol. 2009 Oct 28;165(1-2):1-18. Epub 2009 Jun 6. Review.

174 Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L.

Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. Trends Parasitol. 2008 Jul;24(7):324-30. Epub 2008 May 29. Review.

175 Ciaramella P, Pelagalli A, Cortese L, Pero ME, Corona M, Lombardi P, Avallone L, Persechino A.

Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. Vet J. 2005 May;169(3):465-7.

176 Mylonakis ME, Saridomichelakis MN, Lazaridis V, Leontides LS, Kostoulas P, Koutinas AF. A retrospective study of 61 cases of spontaneous canine epistaxis (1998 to 2001). J Small Anim Pract. 2008 Apr;49(4):191-6. Epub 2007 Sep 7.

¹⁷⁷ Bizzeti M. "La sieroelettroforesi per il controllo nel cane della leishmaniosi". Obiett. Doc. Vet. 1998; 6:11

¹⁷⁸ Ceci L., Petazzi F., Guidi G., Corazza M. "Modificazioni immunoelettroforetiche in cani affetti da leishmaniosi". LA CLINICA VETERINARIA VOL. 108-FASC. 4 luglio-agosto 1985.

¹⁷⁹ Baneth GH "Chemotherapy of canine leishmaniosis" Veterinary Parasitology 2002 106: 315-24.

¹⁸⁰ Bryceson ADM 1987. "The Leishmaniasis" in Biology and Medicine. Vol. II W. Peters, Killick-Kendrick eds. Academic press, Londres: 847-907

¹⁸¹ Oliva G, Foglia Manzillo V, Pagano A. "Canine leishmaniasis: evolution of the chemotherapeutic protocols". Parassitologia. 2004 Jun; 46 (1-2): 231-4

¹⁸² Oliva G, Dvm XR, Crotti A, Maroli M, Castagnaro M, Gradoni L, Lubas G, Paltrinieri S, Zatelli A, Zini E. "Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs." J Am Vet Med Assoc. 2010 Jun 1;236(11):1192-8.

¹⁸³ Slappendel RJ, 1988 Vet Quart. 10: 1-16

¹⁸⁴ Oliva G, Dvm XR, Crotti A, Maroli M, Castagnaro M, Gradoni L, Lubas G, Paltrinieri S, Zatelli A, Zini E. "Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs." J Am Vet Med Assoc. 2010 Jun 1;236(11):1192-8.

-
- ¹⁸⁵ Riera C, Valladares JE, Gállego M, et al. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Vet Parasitol* 1999;84:33–47.
- ¹⁸⁶ Valladares JE, Riera C, González-Ensenyat P, et al. Long term improvement in the treatment of canine leishmaniosis using an antimony liposomal formulation. *Vet Parasitol* 2001;97:15–21.
- ¹⁸⁷ Pennisi MG, Reale S, Giudice SL, et al. Real-time PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. *Vet Res Commun* 2005;29(suppl 2):301–303.
- ¹⁸⁸ Mateo M, Maynard L, Vischer C, et al. Comparative study on the short term efficacy and adverse effects of miltefosine and meglumine antimoniate in dogs with natural leishmaniosis. *Parasitol Res* 2009;105:155–162.
- ¹⁸⁹ Bourdoiseau G, Bonnefont C, Hoareau E, et al. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 1997;59:21–30.
- ¹⁹⁰ Oliva G, Gradoni L, Cortese L, Orsini S, Ciaramella P, Scalone A, de Luna R, Persechino A. "Comparative efficacy of meglumine antimoniate and aminosidine sulphate, alone or in combination, in canine leishmaniasis". *Ann Trop Med Parasitol*. 1998 Mar; 92 (2): 165-71.
- ¹⁹¹ Crende-Casanegra FJ et al. "Alternativa al tratamiento clasico de la leishmaniosis mediante uso de terapia oral". Premios fundacion Purina. 1992. 57-68.
- ¹⁹² Oliva G, Dvm XR, Crotti A, Maroli M, Castagnaro M, Gradoni L, Lubas G, Paltrinieri S, Zatelli A, Zini E Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 2010 Jun 1;236(11):1192-8.
- ¹⁹³ Cavaliero T, Arnold P, Mathis A, et al. Clinical, serologic, and parasitologic follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *J Vet InternMed* 1999;13:330–334.
- ¹⁹⁴ Pennisi MG, Reale S, Giudice SL, et al. Real-time PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. *Vet Res Commun* 2005;29(suppl 2):301–303.
- ¹⁹⁵ Sasanelli M, Paradies P, de Caprariis D, et al. Acute-phase proteins in dogs naturally infected with *Leishmania infantum* during and after long-term therapy with allopurinol. *Vet Res Commun* 2007;31(suppl 1):335–338.
- ¹⁹⁶ Vercammen F, Fernandez-Perez FJ, del Amo C, et al. Follow-up of *Leishmania infantum* naturally infected dogs treated with allopurinol: immunofluorescence antibody test, ELISA and Westernblot. *Acta Trop* 2002;84:175–181.

-
- ¹⁹⁷ Denerolle P, Bourdoiseau G. "Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases)". *J Vet Intern Med.* 1999 Sep-Oct; 13 (5): 413-5.
- ¹⁹⁸ Sundar S, Rai M. Advances in the treatment of leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* 2002;15:593–598.
- ¹⁹⁹ Randall SR et al, 1996 *ARVJ* 57: 1054.
- ²⁰⁰ Oliva G, Gradoni L, Ciaramella P, De Luna R, Cortese L, Orsini S, Davidson RN, Persechino A. "Activity of liposomal amphotericin B (AmBisome) in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*". *J Antimicrob Chemother.* 1995 Dec;36 (6): 1013-9.
- ²⁰¹ Euzeby J 1982 *Rev Med Vet* 133: 383-390.
- ²⁰² Oliva G, Dvm XR, Crotti A, Maroli M, Castagnaro M, Gradoni L, Lubas G, Paltrinieri S, Zatelli A, Zini E. Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2010 Jun 1;236(11):1192-8.
- ²⁰³ Gradoni L. "Recenti sviluppi nella terapia delle leishmaniosi". *Ann. Ist. Super. Sanità*, vol. 37, n. 2 (2001), pp. 255-263.
- ²⁰⁴ Sangraula H, Sharma KK, Rijal S, Dwivedi S, Koirala S. "Orally effective drugs for kala-azar (visceral leishmaniasis): focus on miltefosine and sitamaquine". *J Assoc Physicians India.* 2003 Jul; 51: 686-90
- ²⁰⁵ Sundar S, Jha TK, Sindermann H, Junge K, Bachmann P, Berman J. "Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis" 2002 *Engl J Med.* Nov 28; 347 (22): 1739-46.
- ²⁰⁶ Herwaldt BL. "Miltefosine. The long-awaited therapy for visceral leishmaniasis?" *N Engl J Med* 1999; 341: 1840-2.
- ²⁰⁷ Sindermann H, Engel J. "Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis". *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006 Dec; 100 Suppl 1: S17-20. Epub 2006 May 26
- ²⁰⁸ Mirò G. et al. "Miltefosine: a new treatment for canine Leishmaniosis – preliminary result".
- ²⁰⁹ . Croft SL, Neal RA, Pendergast W, et al. The activity of alkylphosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochem Pharmacol* 1987;36:2633–2666.
- ²¹⁰ Bianciardi P, Fasanella A, Foglia Manzillo V, Trotta T, Pagano A, Sorino S, Gradoni L, Oliva G. "The efficacy of enrofloxacin, alone or combined with metronidazole, in the therapy of canine leishmaniasis". *Parasitol Res.* 2004 Aug; 93 (6): 486-92. Epub 2004 Jul 23.

-
- ²¹¹ Mirò G, Oliva G, Cruz I, et al. Multi-centre and controller clinical field study to evaluate the efficacy and safety of the combination of miltefosine and allopurinol in the treatment of canine leishmaniasis. *Vet Dermatol* 2008;19(suppl 1):7–8.
- ²¹² Rhalem A, Sahibi H, Lasri S, et al. Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. *Vet Immunol Immunopathol* 1999;71:69–76.
- ²¹³ Oliva G, Dvm XR, Crotti A, Maroli M, Castagnaro M, Gradoni L, Lubas G, Paltrinieri S, Zatelli A, Zini E. “Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs.” *J Am Vet Med Assoc*. 2010 Jun 1;236(11):1192-8.
- ²¹⁴ Maroli M, Gradoni L, Oliva G, Castagnaro M, Crotti A, Lubas G, Paltrinieri S, Roura X, Zini E, Zatelli A. Guidelines for prevention of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 2010 Jun 1;236(11):1200-6.
- 215 Gioia BONGIORNO, Fabiana PANCHETTI, Morteza ZAIM, Michele MAROLI Laboratory study to investigate the efficacy of cyfluthrin EW treated nets against phlebotomine sandflies *Ann Ist Super Sanità* 2005;41(2):247-252
- ²¹⁶ Maroli M, Majori G. "Permethrin-impregnated curtains against phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae): laboratory and field studies". *Parassitologia*. 1991 Dec; 33 Suppl: 399-404.
- ²¹⁷ Otranto D, Paradies P, Lia RP, Latrofa MS, Testini G, Cantacessi C, Mencke N, Galli G, Capelli G, Stanneck D. "Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennelled dogs in an endemic area". *Vet Parasitol*. 2007 Mar 31; 144 (3-4): 270-8. Epub 2007 Jan 26.
- ²¹⁸ Aboul Ela RG, Morsy TA, el-Gozamy BM, Ragheb DA "The susceptibility of the Egyptian *Phlebotomus papatasi* to five insecticides". *J Egypt Soc Parasitol*. 1993 Apr; 23 (1): 69-94.
- ²¹⁹ Foglia Manzillo V., Oliva G, Pagano A, Manna L, Maroli M, Gradoni L. "Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs". *Vet Parasitol*. 2006 Nov 30; 142 (1-2): 142-5. Epub 2006 Aug 1.
- ²²⁰ Giffoni JH, de Almeida CE, dos Santos SO, Ortega VS, de Barros AT. "Evaluation of 65% permethrin spot-on for prevention of canine visceral leishmaniasis: effect on disease prevalence and the vectors (Diptera: Psychodidae) in a hyperendemic area". *Vet Ther*. 2002 Winter; 3 (4): 485-92
- ²²¹ Molina R, Miro G, Galvez R, Nieto J, Descalzo MA. "Evaluation of a spray of permethrin and pyriproxyfen for the protection of dogs against *Phlebotomus perniciosus*". *Vet Rec*. 2006 Aug 12; 159 (7): 206-9.

-
- ²²² G., Foglia Manzillo V., Fiorentino E. Modelli di studio di un vaccino e prospettive per un'applicazione di campo. Oliva Leishmaniosi canina: recenti acquisizioni su epidemiologia, implicazioni cliniche, diagnosi, terapia e prevenzione. 2010.
- ²²³ Palatnik de Sousa CB., Barbisa Ade F., Oliveira SM., Nico D., Bernardi RR., Santos WL., et al., (2008). FML vaccine against canine visceral leishmaniasis: from- second generation to synthetic vaccine. *Expert Rev Vaccines*_ 833-51.
- ²²⁴ Mohebbali M., Khamesipour A., Mobedi I., Zarei Z., Fesharki RH. (2004). Double-blind randomized efficacy field trial of alum precipitated autoclaved Leishmania major vaccine mixed with BCG against canine visceral leishmaniasis in Meshkin-Shahr district, I.R. Iran. *Vaccine*;22:4097-4100.
- ²²⁵ Genaro O., Pinto JA., Da Costa CA., Franca-Silva JC., Costa RT., Silva JC., et al. (1996). Phase III randomized double blind clinical trial on the efficacy of a vaccine against canine visceral leishmaniasis in urban area of Montes Claros, MG, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91:116.
- ²²⁶ Cruz A., Coburn CM., Beverley SM. (1991). Double targeted gene replacement for creating null mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*;88:7170-7174.
- ²²⁷ Souza AE., Barres PA., Coombs GH., Mottram JC. (1994). Null mutants for the *lmpa* cysteine proteinase gene in *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 63:213-220.
- ²²⁸ Alexander J., Coombs GH., Mottram JC. (1998). *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mufr mice and potentiate a TH1 response. *J Immunol*;161:6794-6801.
- ²²⁹ Papadopoulou B., Roy G., Breton M., Kunding C., Dumas C., Fillion I., et al. (2002). Reduced infectivity of a *Leishmania donovani* bioprotein transporter genetic mutant and its use as an attenuated strain for vaccination. *Infect Immun* 70:62-68
- ²³⁰ Muyombwe A., Olivier M., Harvie P., Bergeron MG., Ouellette M., papadopoulou B. (1998). Protection against *Leishmania major* challenge infection in mice vaccinated with live recombinant parasites expressing a cytotoxic gene. *J Infect Dis* 177:188—95.
- ²³¹ Davoudi N., Tate CA., Warburton C., Murray A., Mahboudi F., Mc Master WR. (2005). Development of a recombinant *Leishmania major* strain sensitive to ganciclovir and 5-fluoro cytosine for use a live challenge in clinical trials. *Vaccine* 23:1170-1177
- ²³² Yang DM., Fairweather N., Button LL., McMaster WR., Kahl LP., Liew FY. (1999). Oral *Salmonella typhimurium* (AroA-) vaccine expressing a major leishmanial surface protein (gp63) preferentially induces T helper 1 cells and protective immunity against leishmaniasis. *J Immunol* 145:2281—5.
- ²³³ Xu D., McSorley SJ., Chatfield SN., Dougan G., Liew FY. (1995). Protection against *Leishmania major* infection in genetically susceptible BALB/c mice by gp63 delivered orally in attenuated *Salmonella typhimurium* (AroA- AroD-). *Immunology*;85:1-7.

-
- ²³⁴ Connell ND., Medina-Acosta E., McMaster WR., Bloom BR., Russell DG. (1993). Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacille Calmette-Guerin expressing the Leishmania surface proteinase gp63. *Proc Natl Acad Sci U S A* 15:11473-11477.
- ²³⁵ Streit JA., Recker TJ., Donelson JE., Wilson ME. (2000). BCG expressing LCR1 of Leishmania chagasi induces protective immunity in susceptible mice. *Exp Parasitol* 94:33-41.
- ²³⁶ Ramirez JR., Gilchrist K., Robledo S., Sepulveda JC., Moll H , Soldati D , et al. (2001). Attenuated Toxoplasma gondii ts-4 mutants engineered to express the Leishmania antigen KMP-11 elicit a specific immune response in BALB/c mice. *Vaccine* 20:455-461.
- ²³⁷ McMahon-Pratt D., Rodriguez D., Rodriguez JR., Zhang Y., Manson K., Bergman C., et al. (1993). Recombinant vaccinia viruses expressing GP-46/M-2 protect against Leishmania infection. *Infect Immun*;61:3351—3359
- ²³⁸ Gonzalo RM., Del Real G., Rodriguez JR., Rodriguez D., Heljasvaara R., Lucas P., et al. (2002). A heterologous prime-boost regime using DNA and recombinant vaccinia virus expressing the Leishmania infantum P36/LACK antigen protects BALB/c mice from cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 15;20(7—8):1226—31.
- ²³⁹ Ramiro MJ., Zarate JJ., Hanke T., Rodriguez D., Rodriguez JR., Esteban M., et al. (2003) Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by Leishmania infantum is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA vaccine and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine* 21:2474-2484.
- ²⁴⁰ Palatnik de Sousa CB., Gomes EM., Paraguai de Souza E, Luz K., Palatnik M., Borojevic R. (1995) *Leishmania donovani*: titration of antibodies to the fucose mannose ligand as an aid in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89:390-393.
- ²⁴¹ Borja-Cabrera GP. (2000). ‘An’alise do potencial diagn’ostico, progn’ostico e imunoprotetor do ant’igeno FML (Ligante de Fucose Manose) de *Leishmania (L.) donovani*, no calazar canino experimental e de ’area end’emica. *PhD thesis. Universidade Federal Fluminense. pp. 81—98*
- ²⁴² Borja-Cabrera GP. (2000). ‘An’alise do potencial diagn’ostico, progn’ostico e imunoprotetor do ant’igeno FML (Ligante de Fucose Manose) de *Leishmania (L.) donovani*, no calazar canino experimental e de ’area end’emica. *PhD thesis. Universidade Federal Fluminense. pp. 81—98*
- Borja-Cabrera GP., Correia Pontes NN., da Silva VO., Paraguai de Souza E., Santos WR., Gomes EM., et al.(2002). Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (S~ao Gonc,alo do Amarante). *Vaccine* 20:3277—84.

-
- ²⁴³ Santos FN., Borja-Cabrera GP., Miyashiro LM., Grechi J., Reis AB., Moreira MA., et al. (2007). Immunotherapy against experimental canine visceral leishmaniasis with the saponin enriched-Leishmune vaccine. *Vaccine*;25:6176—90.
- ²⁴⁴ Nogueira FS., Moreira MAB., Borja Cabrera GP., Santos FN., Menz I., Parra LE., et al. (2005). Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis. Absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine* 23:4805-4810
- ²⁴⁵ Rachamim N. and Jaffe CL. (1993). Pure protein from *Leishmania donovani* protects mice against both cutaneous and visceral leishmaniasis. *J Immunol* 150:2322—2331.
- ²⁴⁶ Borja-Cabrera GP., Cruz Mendes A., Paraguai de Souza E., Okada LYH., Trivellato FAA., Kawasaki JKA., et al.(2004). Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. *Vaccine* 22(18):2234—43
- ²⁴⁷ Santos FN., Borja-Cabrera GP., Miyashiro LM., Grechi J., Reis AB., Moreira MA., et al. (2007). Immunotherapy against experimental canine visceral leishmaniasis with the saponin enriched-Leishmune vaccine. *Vaccine*;25:6176—90.
- ²⁴⁸ Lemesre JL., Holzmuller P., Cavaleyra M., Bras-GoncalvesR., Hottin G., Papierok G. (2005). Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigote. *Vaccine* 23(22):2825-40
- Lemesre JL., Holzmuller P., Bras-GoncalvesR., BourdiseauG., Hugnet C., Cavaleyra M., Papierok G (2007). Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAP-MDP vaccine in endemic areas of France: Double-blind randomised efficacy field trial. *Vaccine* 25:4223-4234
- ²⁴⁹ Moreno J., Nieto J., Masina S., Cănavate C., Cruz I., Chicharro C., et al. (2007). Immunization with H1, HASPB1 and MML *Leishmania* proteins in a vaccine trial against experimental canine leishmaniasis. *Vaccine*;25:5290—5300
- ²⁵⁰ Gradoni L., Di Muccio T., Scalone A., Gramiccia M. (2010). La leishmaniosi nel Sud Europa: importazione di parassiti ed espansione dei focolai endemici. In *Leishmaniosi canina: recenti acquisizioni su epidemiologia, implicazioni cliniche, diagnosi, terapia e prevenzione. Edizioni Veterinarie (MI)*
- ²⁵¹ Ramiro MJ., Zarate JJ., Hanke T., Rodriguez D., Rodriguez JR., Esteban M., et al. (2003) Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA vaccine and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine* 21:2474-2484.
- ²⁵² Rafati S., Nakhaee A., Taheri T., Taslimi Y., Darabi H., Eravani D., et al. (2005). Protective vaccination against canine visceral leishmaniasis using a combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinases type I and Type II of *L. infantum*. *Vaccine* 23:3716-3725.

-
- ²⁵³ Rodr'iguez-Cort'es A., Ojeda A., L'opez-Fuertes L., Tim'on M., Atlet L., Solano-Gallego L., S'anchez-Robert E., Francino O., Alberol J. (2007). Vaccination with plasmid DNA encoding KMP11, TRYP, LACK, and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. *Vaccine* 25, 7962-7971.
- ²⁵⁴ Borja Cabrera GP., Santos FN., Miyashiro LM., Santos FB., Palatnik de Sousa CB. (2007). Nucleoside hydrolase DNA vaccine against visceral leishmaniasis. *Vaccine Congress. Celebrating 25 years of publication. 9—11 December, the Netherlands, vol. 1, p. 167.*
- ²⁵⁵ Ribeiro J.M. (1995). Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect. Agents Dis.* 4: 143-152.
- ²⁵⁶ Valenzuela JG., Belkaid Y., Garfield MK., Mendez S., Kamhawi S., Rowton ED., Sacks DL., Ribeiro JM. (2001). Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *J Exp Med.* 194(3):331-42.
- ²⁵⁷ Maroli M., Mizzoni V., Siragusa C., D'Orazi A., Gradoni L., 2001. *Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in souther Italy.* Medical and Veterinary Entomology, 15, 358-363.
- ²⁵⁸ Paltrinieri S. et al. *Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs JAVMA, vol 236, No. 11, jiune 1, 2010.*
- ²⁵⁹ Erika Rossi, Laura Rinaldi, Vincenzo Musella, Vincenzo Veneziano, Sabrina Carbone, Luigi Gradoni, Giuseppe Cringoli, Michele Maroli "Mapping the main *Leishmania* phlebotomine vector in the endemic focus of the Mt. Vesuvius in southern Italy" *Geospatial Health* 2, 2007, pp. 191-198
- ²⁶⁰ Erika Rossi, Laura Rinaldi, Vincenzo Musella, Vincenzo Veneziano, Sabrina Carbone, Luigi Gradoni, Giuseppe Cringoli, Michele Maroli "Mapping the main *Leishmania* phlebotomine vector in the endemic focus of the Mt. Vesuvius in southern Italy" *Geospatial Health* 2, 2007, pp. 191-198
- ²⁶¹ Mathis et al., 1995 Mathis A., Deplazes P., 1995. *PCR and in vitro cultivation for detection of Leishmania spp. In diagnostic samples from humans and dogs.* Journal of Clinical Microbiology, 33, 1145-1149.
- ²⁶² Van Eys et al., 1992 Van Eys G.J.J.M., Schoone G.J., Kroon N.C.M., Ebeling S.B., 1992. *Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of Leishmania parasites.* Molecular and Biochemical Parasitology, 51, 133-142.
- ²⁶³ Oliva et al. "Incidence and time course of *Leishmania Infantum* infections examined by parasitological, serologic and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to 3 consecutive transmission seasons" *Journal of clinical microbiology*, 2006, p.1318-1322

²⁶⁴ Van Eys G.J.J.M., Schoone G.J., Kroon N.C.M., Ebeling S.B., 1992. *Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use detection and identification of Leishmania parasites*. Molecular and Biochemical Parasitology, 51, 133-142.